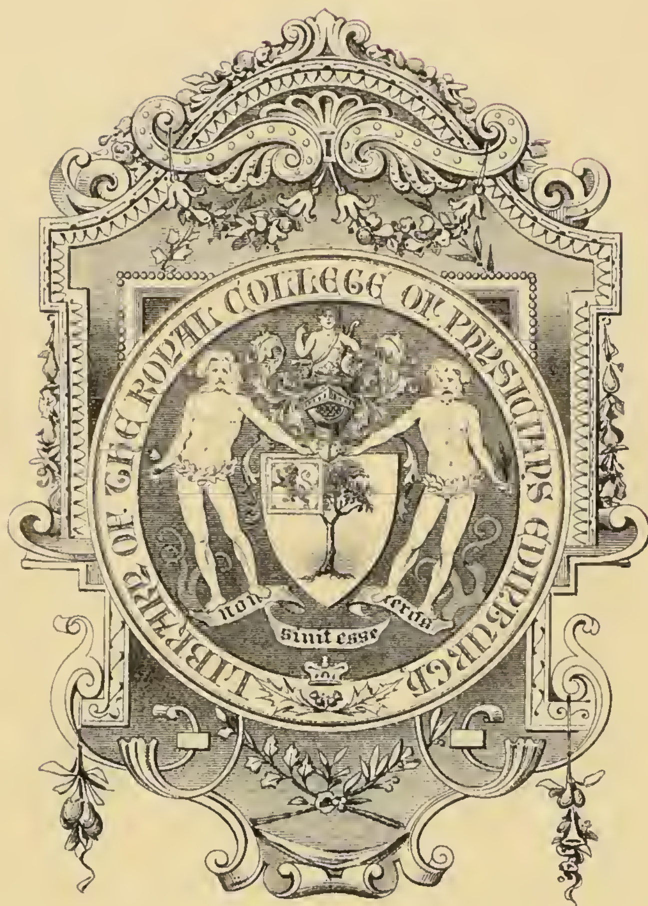

LIBRARY OF THE ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS EDINBURGH
non sinit esse feros


R.C.P. EDINBURGH LIBRARY
R26978A0236

Die Chemie des Harns.

Die Chemie des Harns.

Ein Lehr- und Arbeitsbuch
für
Studierende, Aerzte, Apotheker und Chemiker
zum Gebrauche
in Laboratorien und beim Selbstunterricht.

Von

Dr. W. Autenrieth,
a.o. Professor an der Universität Freiburg i. B.

Mit 28 Abbildungen.



Tübingen
Verlag von J. C. B. Mohr (Paul Siebeck)
1911.

Druck von H. Laupp jr. in Tübingen.

Vorwort.

Wie aus dem Titel des Buches zu ersehen ist, soll das neue Werkchen nicht nur ein Leitfaden, ein »A r b e i t s b u c h«, für harnchemische Untersuchungen sein, das die Reaktionen zum Nachweise der im Harne vorkommenden Substanzen und die Bestimmungsmethoden der letzteren eingehend behandelt, sondern es soll auch beim theoretischen Studium der Harnchemie als L e h r b u c h dienen. Aus diesem Grunde habe ich die Chemie der normalen und pathologischen Bestandteile des Menschenharns in ausführlicher Weise behandelt; hierbei haben die in physiologischer oder medizinischer Hinsicht wichtigeren Harnbestandteile naturgemäß weit größere Beachtung gefunden, als solche Substanzen, denen nach dem heutigen Stande der Wissenschaft eine derartige Bedeutung nicht zukommt. Gerade dieser ziemlich ausführlich gehaltene rein chemische Teil des Buches dürfte manchem Mediziner erwünscht sein, der in der Regel seine chemischen Untersuchungen nach kurz gefaßten Vorschriftenbüchern auszuführen pflegt, welche keinerlei Erklärungen für die in Frage kommenden chemischen Prozesse enthalten. Es ist aber selbstverständlich, daß ein jeder, der sich mit harnchemischen Arbeiten zu beschäftigen hat, diese mit größerem Verständnisse und mit einem höheren Grade von Sicherheit ausführen wird, wenn er die dabei in Betracht kommenden chemischen Vorgänge genau kennt, als wenn dies nicht der Fall ist. Denken wir hierbei an selbst so einfache Untersuchungen des Harns, wie an die Indikanprobe oder an die quantitative Bestimmung der Aetherschwefelsäuren oder des Traubenzuckers im Harn.

Ferner haben in dem Buche physiologisch-chemische Angaben, insofern sich diese auf das Vorkommen und die Entstehungsweise der einzelnen Harnbestandteile im Tierkörper beziehen, weitgehende Beachtung gefunden. Hierbei habe ich insbesondere auch auf die Bedürfnisse des Nichtmediziners, nämlich des Apothekers und des Chemikers, Rücksicht genommen, indem manche Angaben aus dem Gebiete der physiologischen Chemie zum besseren Verständnisse eingehender erläutert werden, als dies für Mediziner allein wohl notwendig wäre.

Unter der Zahl der Reaktionen, welche zum Nachweise der einzelnen Harnbestandteile dienen, wie auch unter den Bestimmungsmethoden für dieselben, ist eine Auswahl in dem Sinne getroffen worden, daß nur erprobte und allgemein angewandte, bekanntere Methoden des Nachweises

und der Bestimmung Aufnahme gefunden haben. Eine Ausnahme von dieser Regel kommt nur bei einigen Abschnitten vor.

Die Literatur, wenigstens die der letzten 10 Jahre, ist, soweit es der Umfang des Buches gestattete, ziemlich eingehend berücksichtigt worden.

In einem Abschnitte des Anhanges sind die wichtigeren Synthesen, die sich im tierischen Organismus vollziehen können, behandelt; ebenda finden sich kürzere Angaben über die Ausscheidung körperfremder organischer Substanzen durch den Harn.

Hinsichtlich der nur kurz oder gar nicht aufgenommenen Bestimmungsmethoden ist wiederholt auf die betreffenden Abschnitte der ausführlichen Werke für die physiologisch-chemische Analyse hingewiesen worden, insbesondere auf Hoppe-Seyler-Thierfelder's, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse und auf Neubauer-Huppert's Analyse des Harns.

Das Buch ist seiner ganzen Anlage nach in erster Linie für den Studierenden bestimmt; aber auch dem fertigen Arzte, Apotheker und Chemiker wird das kleine Werk bei harnanalytischen Untersuchungen in vielen Fällen gute Dienste leisten.

Dem Besitzer von J. C. B. Mohr's Verlag, Herrn Dr. Paul Siebeck, spreche ich für das stets gezeigte Entgegenkommen auch an dieser Stelle meinen Dank aus.

Freiburg i. B., Oktober 1911.

W. Autenrieth.

Inhaltsverzeichnis.

Allgemeines und physikalische Eigenschaften des Harns.

Der normale Harn des Menschen stellt eine wässerige Lösung von anorganischen und organischen Stoffen dar, welche als Endprodukte des Stoffwechsels zur Ausscheidung gelangen. Die Bildung und Ausscheidung des Harns erfolgt in den Nieren, die aus dem Blute solche Stoffe aufnehmen, welche für den Organismus nicht weiter verwertbar sind oder die sogar eine schädliche Wirkung ausüben können, falls sie im Blute, überhaupt im Organismus, zurückgehalten und nicht ausgeschieden werden. Der fertige Harn gelangt durch die Harnleiter (Ureteren) in die Harnblase und wird schließlich durch die Harnröhre entleert.

Der Harn zeigt eine höchst komplizierte Zusammensetzung, die bei den verschiedenen Lebewesen meist eine recht verschiedene ist. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung des Harns sind, wenigstens zum großen Teil, durch die verschiedene Ernährungsweise der betreffenden Individuen bedingt; dies geht daraus hervor, daß die Harne ganz verschiedener Lebewesen aber mit ähnlicher Ernährungsweise ähnliche Eigenschaften aufweisen und chemisch gleich oder nahezu gleich zusammengesetzt sind. Der Harn der verschiedenen Fleischfresser reagiert beispielweise fast immer sauer und ist frisch gelassen klar und durchsichtig, während der frisch abgesonderte Harn der ausgesprochenen Pflanzenfresser meist stark alkalische Reaktion zeigt und durch ausgeschiedene Phosphate und Carbonate häufig trübe erscheint.

Für das Wasser, die gelösten Mineralstoffe und die stickstoffhaltigen Endprodukte des Stoffwechsels ist der Harn das wichtigste Exkret des tierischen Organismus, indem er in vielen Fällen wichtige Anhaltspunkte und Aufschlüsse über den Verlauf des Stoffwechsels geben kann. — Durch die chemische Untersuchung des Harnes werden in erster Linie pathologische Bestandteile erkannt, also Stoffe, welche normalerweise im Harne nicht vorkommen; ferner kann durch genaue quantitative Untersuchungen ermittelt werden, ob die normalen Harnbestandteile sich in richtiger, also normaler Menge im Harne vorfinden, oder ob in dieser Hinsicht Abweichungen von der normalen Zusammensetzung vorkommen.

Im weiteren kann die chemische Untersuchung des Harns in vielen Fällen wichtige Aufschlüsse zur Entscheidung der Frage liefern, ob innerlich dargereichte Arzneimittel, Gifte oder irgendwelche andere Substanzen, resorbiert werden und, falls dies zutrifft, in welcher Weise dieselben im leben-

den Organismus chemisch umgewandelt und mit dem Harne ausgeschieden werden. Dadurch, daß man in den letzten Jahrzehnten in systematischer Weise organische Substanzen bestimmter Zusammensetzung an Tiere verfüttert und alsdann den während der Versuchsperiode gelassenen Harn untersucht hat, hat man die verschiedenen chemischen Prozesse, welche sich im tierischen Organismus abspielen können, genau kennen gelernt. Durch derartige Versuche hat man die interessanten Synthesen entdeckt, welche der lebende tierische Organismus auszuführen vermag.

Durch die chemische und besonders die mikroskopische Untersuchung auf solche Bestandteile, welche der Harn auf seinem Wege aus der Niere, den Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre aufnehmen kann, wird man in manchen Fällen den Zustand dieser Organe beurteilen können.

Menge des Harns. Die Menge des in 24 Stunden gelassenen Harns beträgt bei einem erwachsenen gesunden Manne durchschnittlich 1500 ccm, bei der Frau in der Regel weniger, nämlich 900—1200 ccm. Die innerhalb einer bestimmten Zeit abgesonderte Menge Harn ist bei ein und demselben Individuum großen Schwankungen unterworfen und ist in erster Linie abhängig von der Flüssigkeitsmenge, welche dem Körper zugeführt wird, andererseits aber auch von der Menge Wasser, welche den Körper auf anderen Wegen verläßt als auf demjenigen durch die Nieren. Es wird demnach die Harnabsonderung sowohl durch reichliche Wasserzufuhr, als auch durch Verminderung der Wasserabführung auf anderen Wegen als auf dem durch die Nieren vermehrt, und umgekehrt wird sie vermindert, wenn die Wasserzufuhr gering ist, oder die Wasserverluste auf den anderen Wegen gesteigert sind. Für gewöhnlich wird beim gesunden Menschen durch die Nieren so viel Wasser ausgeschieden, wie durch Haut, Lunge und Darm zusammengenommen. Bei niedriger Temperatur und bei feuchter Luft, Verhältnisse, unter welchen die Wasserausscheidung durch die Haut herabgesetzt ist, kann also die Harnabsonderung zunehmen, während sie bei trockener Sommerhitze in Folge reichlicher Schweißabsonderung meist stark vermindert ist. Das Gleiche ist der Fall bei heftigen Diarrhöen oder starkem Erbrechen. Vermindert ist die Harnmenge bei allen akuten fieberhaften Krankheiten und bei Vergiftungen z. B. durch Quecksilbersublimat, Arsen und Blei. Bei Sublimatvergiftung kann völlige Anurie auftreten, ebenso bei Verschluß der Harnleiter in Folge mechanischer Hindernisse. — Verschiedene, zum Teil schon sehr lange bekannte Arzneimittel bewirken eine vermehrte Harnabsonderung. Zu diesen harntreibenden Mitteln (Diuretica) gehören u. a. Digitalis, die Wachholderbeeren, die Meerzwiebel, das essigsaure Kalium und der Alkohol. Von neueren Arzneimitteln, welche stark diuretisch wirken, seien das Theobrominnatriumsalicylat oder Diuretin und das Theophyllin erwähnt[1]). Stark vermehrt

[1]) Die Konstitutionsformeln von Theobromin oder 3,7-Dimethylxanthin und Theophyllin oder 1,3-Dimethylxanthin sind die folgenden:

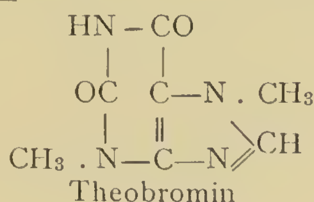
ist die Harnmenge beim Diabetes. Die in 24 Stunden abgesonderte Menge Harn kann bei dieser Krankheit 3000 bis 5000 ccm und mehr betragen.

Aussehen und Konsistenz des Harns. Der frisch gelassene Harn des Menschen und der fleischfressenden Säugetiere erscheint *klar* und vollkommen *durchsichtig*, ist dünnflüssig, beweglich und gibt bei nicht zu starkem Schütteln mit Luft einen dünnen, weißen Schaum, der bald wieder verschwindet., Manchmal zeigt der Harn eine schwache Fluoreszenz. Läßt man den frisch gelassenen Harn einige Zeit stehen, so scheidet er in der Regel ein leichtes Wölkchen aus, *nubecula* genannt, welches aus Harnmukoid besteht und in welchem Epithelzellen und Calciumoxalatkrystalle sich häufig vorfinden. Enthält ein Harn reichlich Urat, so daß er mit diesem gesättigt ist, so kann sich der klar gelassene Harn beim Abkühlen auf Zimmertemperatur trüben und einen lehmgelben, rosafarbigen oder ziegelroten Niederschlag absetzen; es ist dies das sogenannte *Ziegelmehlsediment* oder *sedimentum lateritium* des Harns, das bei *gelindem* Erwärmen auf Bluttemperatur wieder verschwindet und in Lösung geht.

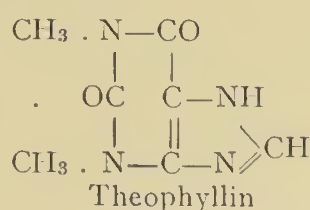
Bei rein *vegetabilischer* Nahrung kann es vorkommen, daß ein *trüber* Harn abgesondert wird. Die Trübung ist dann meist die Folge der alkalischen Reaktion des Harns und durch ausgeschiedene Carbonate und Phosphate der alkalischen Erden bedingt. Aus demselben Grunde ist der Harn der typischen Pflanzenfresser mehr oder weniger trübe. Auf Zusatz von verdünnter Salzsäure verschwindet diese Trübung, nicht aber bei gelindem Erwärmen (Unterschied von dem Sedimentum lateritium).

Geschmack und Geruch des Harns. Der Harn schmeckt durch seinen Gehalt an Kochsalz und Harnstoff salzig und gleichzeitig schwach bitter. Der Harn der Zuckerkranken kann bei größerem Zuckergehalte einen deutlich süßen Geschmack zeigen.

Der *Geruch* des Harns ist eigentümlich aromatisch. Die Stoffe, welche den Geruch bedingen, sind bis jetzt nicht bekannt. Ein in die ammoniakalische *Harngährung* übergegangener Harn riecht stark nach Ammoniak. Einen Geruch nach *Schwefelwasserstoff* zeigt ein Harn bei schwerem Blasenkatarrh (Cystitis), oder wenn Bacterium coli in die Harnblase gekommen ist. — Nach dem Genusse verschiedener Speisen und Einnehmen mancher Arzneimittel nimmt der Harn einen charakteristischen Geruch an; z. B. riecht der Harn nach Einnahme von *Terpentin* oder Terpentinöl angenehm nach Veilchen, während er nach dem Essen von *Spargeln* einen widerlichen, merkaptanähnlichen Geruch annimmt. Von Arzneimitteln geben *Baldrian*, *Castoreum* und *Cubeben* von ihren Riechstoffen an den Harn ab, wenn sie innerlich eingenommen werden.



Theobromin



Theophyllin

Farbe des Harns. Die Farbe des normalen Harns vom Menschen ist hellgelb; im allgemeinen schwankt die Farbe mit der Konzentration und zwar in dem Sinne, daß ein Harn von geringem Gehalte an festen Bestandteilen blaß strohgelb gefärbt ist, aber rotgelb bis braunrot bei stärkerer Konzentration. Eine Ausnahme von dieser Regel, daß die Intensität der Färbung des Harns der Konzentration parallel läuft, bildet der Diabetikerharn, welcher bei einem erheblichen Gehalte an festen Substanzen, nämlich an Traubenzucker, und bei hohem spez. Gew. meist eine blaßgelbe Farbe hat. Manche Harne nehmen beim Stehen am Licht und an der Luft allmählich eine dunklere Färbung an; es sind dies besonders solche Harne, die ein Chromogen wie Urobilinogen, enthalten, das erst am Lichte den Farbstoff abspaltet.

Eine dunklere Färbung kann auch auf einen Gehalt des Harns an pathologischen, anormalen, Bestandteilen oder an Arzneimitteln, die innerlich dargereicht wurden, zurüekzuführen sein. Gallenfarbstoffe, Hämatin, Methämoglobin, Hämatoporphyrin färben den Harn dunkler, wenn sie in diesen übergehen. Methämoglobin findet sich im Harne bei verschiedenen Vergiftungen vor, beispielsweise durch chlorsaures Kalium, Kaliumdichromat, Anilin, Nitrobenzol, Alkalinitrit sowie Amylnitrit, und Hämatoporphyrin ist wiederholt bei schwerer Sulfonalintoxikation im Harne des Menschen beobachtet worden. Solche Sulfonalharne sind oftmals weinrot oder kirschrot bis rotbraun gefärbt. — Rote Farbe kann der Harn durch einen reichlichen Gehalt an Urobilin zeigen, das sich bei fieberhaften Krankheiten und Digestionsstörungen meist reichlich im Harne vorfindet. Diese Rotfärbung ist nicht zu verwechseln mit derjenigen, welche durch vorhandenes Blut bedingt ist; in diesem Falle lassen sich im Sediment häufig rote Blutkörperchen nachweisen. — Eine gelbgrüne oder grüne, gelbbraune oder bierbraune Färbung zeigt der Harn in Folge eines Gehaltes an Gallenfarbstoffen bei Gelbsucht (Ikterus). Beim Schütteln liefert der ikterische Harn in der Regel einen gelb oder gelbgrün gefärbten Schaum; ein derartiger Harn ist meist trübe, und das Sediment ist, besonders, wenn es Epithelzellen enthält, durch Gallenfarbstoffe stark gefärbt.

Auch eine blaue Färbung, ein blaues Häutchen mit rotem metallischem Glanz oder ein blaues Sediment im Harn, ist schon wiederholt beobachtet worden; falls nicht Methylenblau eingegeben wurde, rührt eine derartige Blaufärbung wohl immer von Indigo her, der dann aus Harnindikan, einem normalen Harnbestandteil, entstanden ist.

Eine bräunliche, braune oder braunschwarze Färbung zeigen alle Harne, die reich an aromatischen Substanzen, besonders reich an gepaarten Schwefelsäuren und Glukuronsäuren sind. Bei Alkaptonurie färbt sich der Harn beim Stehenlassen an der Luft, in Folge seines Gehaltes an Homogentisinsäure stark dunkel, schwarz, tintenartig.

Milchiges Aussehen zeigen die Harne durch einen Fettgehalt

bei Chylurie. Eine sehr blasse Färbung zeigt der Harn beim Diabetes in Folge der großen Harnmenge, welche vom Diabetiker in der Regel abgesondert wird, und bei Chlorose (Bleichsucht). Auch bei chronischer Nephritis und bei chronischen Rückenmarkerkrankungen soll der Harn häufig eine auffallend blasse Färbung zeigen.

Nach innerlicher Darreichung verschiedener Arzneimittel ist der Harn unter Umständen stark und abnorm gefärbt, und zwar:

Goldgelb oder grünlichgelb nach Arzneimitteln, welche Chrysophansäure enthalten, wie nach Rheum, Senna, Frangula; auf Zusatz von Alkalien färbt sich ein derartiger Harn rot, um durch überschüssige Säure wieder rotgelb zu werden. Nach Einnahme von Santonin nimmt der Harn eine citronengelbe Färbung an, welche beim Alkalisieren in purpurrot übergeht. — Eine gelbrote Färbung nimmt der Harn nach dem Gebrauche von Antipyrin an; gleichzeitig zeigt der Antipyrinharn Dichroismus, indem er im durchfallenden Lichte rot, im reflektierten Lichte aber grünlich erscheint.

Eine hell purpurrote Färbung zeigt der Harn nach Einnahme von Pyramidon; ein Pyramidonharn scheidet zuweilen ein aus roten Nädelchen bestehendes Sediment ab.

Grünlichbraun, braun, schwarzbraun bis tiefschwarz gefärbt ist ein Harn und zwar entweder frisch gelassen oder beim Stehenlassen an der Luft, nach Eingabe von Phenolen: Carbolsäure, Kresole, Thymol, Brenzkatechin, Guajakol, Kreosot, Resorcin, Gerbsäure. Auch nach Eingabe von Naphtalin verhält sich der Harn wie ein Carbolharn.

Olivgrün bis grünschwarz ist ein Harn nach Salol, Pyrogallol und Arbutin. Blau, blaugrün oder dunkelblau nach dem Gebrauche von Methylenblau.

Nach Einnahme von Copaivabalsam färbt sich der Harn beim Ansäuern mit Salzsäure rosarot oder purpurrot; gleichzeitig trübt sich der Harn durch ausgeschiedenes Harz.

Zeigt also ein Harn eine abnorme Färbung, entweder frisch gelassen oder beim Stehenlassen an der Luft, so untersuche man zunächst, ob die Färbung nicht durch ein innerlich dargereichtes Arzneimittel bedingt sein kann.

Spezifisches Gewicht des Harns. Das spezifische Gewicht des Harns ist großen Schwankungen unterworfen, indem es zwischen 1,000 und 1,050 schwanken kann. Bei normaler Ernährungsweise und bei nicht allzu großer Zufuhr von Flüssigkeiten hat der Harn des Menschen ein spez. Gew. von 1,015 bis 1,020. Bei reichlichem Wassertrinken kann das spez. Gew. auf 1,005 und tiefer sinken, andererseits kann es bei sehr starker Schweißabsonderung oder wenn die Aufnahme von wässeriger Flüssigkeit gering ist und wenn gleichzeitig feste Stoffe reichlich in den Harn übergehen, bis auf 1,035 und 1,040 in die Höhe gehen. Das spez. Gew. ist selbstverständlich umso höher, je mehr feste Substanzen der Harn enthält; man kann also aus dem spez. Gewichte des

Harns auf die Gesamtmenge an festen Substanzen im Harn zurückschließen. Das spez. Gew. kann man als den Ausdruck der Summe der festen Substanzen ansehen; freilich ist diese Proportionalität keine ganz direkte, da die verschiedenen, im Harne vorkommenden Substanzen ein verschiedenes spez. Gewicht haben. Von den beiden Substanzen, welche sich im Menschenharn in größter Menge vorfinden, hat das Kochsalz das spez. Gew. von 2,15 und der Harnstoff ein solches von 1,35. Eine Zunahme des Gehaltes an letzterem bewirkt also keine so starke Steigerung des spez. Gew. des Harns wie eine gleich große Zunahme an Kochsalz. — Der erwachsene Mann entleert auf 1 Kilogramm Körpergewicht im Durchschnitt 1 g fester Stoffe durch den Harn. — Nach dem Gesagten liegt die Bedeutung der Bestimmung des spez. Gewichts vom Harne darin, daß man dadurch ein Mittel an der Hand hat, die Gesamtmenge der festen Stoffe, welche mit dem Harne den Organismus verlassen, annähernd kennen zu lernen. Da die zu verschiedenen Zeiten des Tages gelassenen Harnmengen meist eine ganz verschiedene Konzentration, also auch ein verschiedenes spezifisches Gewicht haben, so muß man die im Laufe von 24 Stunden gelassenen Harnmengen aufsammeln, gut mischen, in einem geeigneten Meßzylinder ihr Gesamtvolumen ermitteln und erst dann von einer Probe des gemischten Harns das spez. Gewicht bestimmen.

Man wendet für die Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Harns in der Regel die araeometrische Methode an und bedient sich hierbei zu diesem Zweck besonders konstruierter Araeometerspindeln, der sogenannten Urometer, die mit einer Skala von 1,000 bis 1,040 versehen sind. Für genauere wissenschaftliche Untersuchungen empfiehlt es sich, zwei Urometer zu benützen, von welchen das eine für spezifische Gewichte von 1,000 bis 1,020, das andere für solche von 1,020, bis 1,040 gradiert ist.

Ausführung. Man gießt den klaren, zuvor filtrierten Harn vorsichtig in einen trockenen Glaszylinder, so daß sich kein Schaum und keine Luftblasen bilden. Sollten sich diese trotzdem bilden, so müssen sie mit Hilfe eines Glasstabes oder mit Filtrierpapier erst beseitigt werden. Nun taucht man das trockene Urometer in den Harn und zwar so, daß es frei in der Flüssigkeit schwimmt und an keiner Stelle die Glaswand des Zylinders berührt. Man drückt dann das Araeometer mit dem Finger um einige Skalenteile tiefer in den Harn, läßt es wieder aufsteigen und wartet mit dem Ablesen, bis es wieder ruhig steht. Zum Ablesen bringt man das Auge in eine Ebene mit dem unteren Flüssigkeitsrande und liest dann die Stelle an der Skala ab, wo diese Ebene die Skala des Urometers schneidet. Ein in einem Harne vorhandenes Ziegelmehlsediment muß vor der Bestimmung des spez. Gew. durch ganz gelindes Erwärmen erst in Lösung gebracht werden. — Jedes Urometer ist für eine bestimmte Temperatur, meist 15^0 C., die auf dem Instrumente angegeben ist, gradiert. Hat man die Ablesung am Urometer bei einer anderen

als der angegebenen Temperatur vorgenommen, so muß eine Korrektur angebracht werden.

Für je 3 Temperaturgrade über der Normaltemperatur, für die das Urometer geeicht ist, muß man dem abgelesenen Werte einen Araeometergrad zuzählen und für je 3 Temperaturgrade unterhalb derselben muß man von dem abgelesenen Werte einen Araeometergrad abziehen. Wenn beispielsweise ein für $+ 15^0$ geeichtes Urometer in einem Harne von $+ 24^0$ ein spezifisches Gewicht von 1,014 anzeigt, so ist das richtige spez. Gew. des Harns bei $+ 15^0 = 1{,}014 + 0{,}003 = 1{,}017$.

Wie schon wiederholt hervorgehoben wurde, kann die im Verlaufe von 24 Stunden abgesonderte Harnmenge bedeutend schwanken. Anders verhält es sich mit den innerhalb der gleichen Zeit abgesonderten festen Stoffen, deren Menge, selbst bei stark schwankender Harn- also Wassermenge, ziemlich konstant ist, und zwar umso mehr, je gleichmäßiger die Ernährungsweise des betreffenden Individuums ist. Die Gesamtmenge der in 24 Stunden von einem erwachsenen Manne ausgeschiedenen festen Stoffe beträgt durchschnittlich 60 Gramm. Man kann die Menge der in einem Harne gelösten festen Stoffe wenigstens annähernd aus dem spez. Gew. des Harns in der Weise berechnen, daß man die zweite und dritte Stelle der das spez. Gew. angebenden Zahl mit dem sogenannten Häser'schen Koeffizienten 2,33 multipliziert. Dieses Produkt gibt dann die Menge der festen Stoffe in 1000 ccm Harn an.

Beispiel. Werden in 24 Stunden 1150 ccm Harn vom spez. Gew. 1,021 abgesondert, so beträgt die Menge der festen Stoffe in 1000 ccm dieses Harns $21 \times 2{,}33 = 48{,}93$ gr.

In der Tagesmenge Harn sind dann nach der Proportion

$$1000 : 48{,}93 = 1150 : x \quad (x = 56{,}27)$$

56,27 g feste Bestandteile enthalten gewesen.

Bei reichlicher Harnabsonderung, Polyurie, hat der normale Harn, wie bereits bemerkt würde, meist ein niedriges spez. Gew. Eine wichtige Ausnahme von dieser Regel bildet der Harn der Zuckerkranken, welche in der Regel reichlich Harn absondern, 3 bis 4 bis 8 Liter pro die, aber einen Harn liefern, dessen spez. Gew. infolge des Zuckergehaltes ein sehr hohes sein kann, nämlich ein solches von 1,030 bis 1,040.

Optische Aktivität und Fluoreszenz des Harns. Fast jeder normale Harn des Menschen und der Säugetiere ist optisch aktiv, nämlich schwach linksdrehend. Takayasu[1]) hat von 100 normalen Urinproben 93 gefunden, welche nach links drehten und zwar betrug die Drehung nicht weniger als $- 0{,}01^0$ und selten mehr als $- 0{,}04^0$. Eine Drehung von $- 0{,}1^0$ wurde sehr selten gefunden. Die Linksdrehung des Harns ist also in den allermeisten Fällen so gering, daß sie ohne praktische Bedeutung ist für die polarimetrische Bestimmung

[1]) Zentralblatt für innere Medizin 1908, S. 337.

des Traubenzuckers im Zuckerharn. Nur 9 von den untersuchten 100 Harnen zeigten keine nachweisbare Linksdrehung.

Der Harn des Menschen zeigt fast immer eine deutlich wahrnehmbare Fluoreszenz. Blaßgelbe normale Harne fluoreszieren häufig bläulich, gelbrote Harne mehr grünlich oder gelblich. Eiweißhaltiger Harn zeigt in der Regel eine lebhaftere Fluoreszenz als normaler Harn.

Reaktion des Harns. Die Reaktion eines Harns ist in erster Linie von der Art und Zusammensetzung der Nahrung abhänig. Der Fleischfresser sondert fast immer einen sauer reagierenden und der Pflanzenfresser einen neutralen oder alkalischen Harn ab. Wie abhängig die Reaktion des Harns von der Beschaffenheit der Nahrung ist, geht daraus hervor, daß der Harn des Fleischfressers weniger sauer oder sogar neutral wird, wenn man den letzteren auf Pflanzenkost setzt, und daß andererseits der Pflanzenfresser im Hungerzustande einen sauer reagierenden Harn absondern kann, wenn er also gezwungen ist, auf Kosten seiner eigenen Fleischmasse zu leben.

Der Harn des gesunden Menschen reagiert bei gemischter Kost sauer. Es müssen also im Harne des Menschen und Fleischfressers mehr Säure äquivalente als Basenäquivalente vorhanden sein. Dies hängt damit zusammen, daß bei der Verbrennung der organischen Nahrungsmittel im Organismus des Menschen aus neutralen Substanzen wie den Eiweißstoffen Säuren hervorgehen, nämlich Schwefelsäure, Phosphorsäure und organische Säuren, wie Oxalsäure, Hippursäure, aromatische Oxysäuren, Harnsäure und Oxyproteïnsäuren. An der sauren Reaktion des Harns sind diese verschiedenen sauren Bestandteile im Verhältnisse ihrer Jonisation beteiligt. Die Art der Ernährung bedingt übrigens beim Menschen nicht ausschließlich den Säuregrad des Harns. — Ein großer, sogar der größte Teil der bei der Verbrennung der organischen Nahrungsstoffe hervorgehenden Säuren wird durch die dem Organismus zur Verfügung stehenden basischen Bestandteile neutralisiert. Gerade beim Menschen und noch mehr beim Fleischfresser geht der Säuregrad des Harns kaum über eine obere Grenze hinaus, und zwar auch dann nicht, wenn eine Mineralsäure oder eine schwer verbrennliche organische Säure in größerer Menge dem Körper einverleibt wird. — Es hat sich hierbei gezeigt, daß die aufgenommenen Säuren nur zum kleinen Teile von den Alkalien und Erdalkalien des Körpers neutralisiert werden; bei weitem die größte Menge des Säureüberschusses wird durch das aus dem Eiweiß oder dessen Zersetzungsprodukten abgespaltene Ammoniak abgesättigt, so daß schließlich die aufgenommenen Säuren zum allergrößten Teil als Ammoniumsalze mit dem Harn ausgeschieden werden. Immerhin kann die saure Reaktion des Harns gesteigert werden durch Zufuhr von Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Milchsäure. Auch bei angestrengter Muskeltätigkeit, wobei Fleischmilchsäure gebildet wird, nimmt die saure Reaktion des Harns meist stark zu.

Weniger sauer oder alkalisch kann der Harn werden:

1. Nach dem Genusse von Alkalien, von kohlensauren und solchen

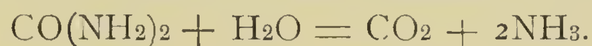
pflanzensauren Alkalisalzen, welche im Organismus zu kohlensauren Salzen verbrannt werden. Dies ist beispielsweise der Fall nach Einnahme von essigsaurem, apfelsaurem, weinsaurem oder citronensaurem Kalium oder Natrium.

2. Durch Beimischung von Blut oder Eiter zum Harn, da diese Körperflüssigkeiten stets alkalisch reagieren.

3. Wenn alkalisch reagierende Transsudate[1]), Serum oder Blut, resorbiert werden.

4. Bei sehr reichlicher Schweißabsonderung.

5. Wenn die »ammoniakalische Gärung« des Harns bereits eingesetzt hat. Der frisch gelassene, sauer reagierende Harn des Menschen bleibt selbst mehrere Tage nahezu unverändert, wenn er in absolut reinen Gefäßen bei kühler Temperatur aufbewahrt wird. Allmählich aber wird der Harn durch Mikroorganismen, die sich in ihm angesiedelt haben, verändert; er nimmt eine starke alkalische Reaktion an und wird durch ausgeschiedene Phosphate trübe. Unter dem Einflusse verschiedener Mikroorganismen (Micrococcus ureae, Bacterium ureae) wird dann der Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak zerlegt.



$$CO(NH_2)_2 + H_2O = CO_2 + 2NH_3.$$

Das entstandene Ammoniak gibt sich durch den Geruch und dadurch zu erkennen, daß sich ein über den Harn gehaltenes angefeuchtetes rotes Lackmuspapier bläut. Bei Blasenkatarrh tritt die ammoniakalische Harngärung schon in der Harnblase ein; es wird dann ein trüber Harn entleert, der die angegebenen Eigenschaften zeigt.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der einige Stunden nach einer reichlicheren Mahlzeit abgesonderte Harn weniger sauer oder sogar alkalisch reagieren kann und zwar so lange, als die Sekretion des, freie Salzsäure enthaltenden Magensaftes anhält.

Acidität des Harns. Im modernen, physikalisch-chemischen Sinne versteht man unter Acidität die Jonenacidität, welche die Konzentration der Wasserstoffionen im Harne angibt. Durch Titration der Acidität, unter Verwendung von Phenolphtaleïn als Indikator, erfährt man die Menge des im Harne vorhandenen und durch Metall vertretbaren Wasserstoffs = »Titrationsacidität« nach H. Thierfelder[2]).

Bestimmung der Titrationsacidität.

Nach Naegeli[3]). Man bringt 10 oder 20 ccm des Tagesurins in ein Becherglas, verdünnt mit Wasser bis auf ein helles Weingelb, fügt auf 10 ccm des unverdünnten Harns 1 ccm einen 1%igen alkoho-

---

[1]) Transsudate sind Ausschwitzungen aus dem Blute, die auch in ihrer Zusammensetzung der Blutflüssigkeit gleichen; sie sind klar, durchsichtig, farblos oder schwach gelb gefärbt und reagieren alkalisch.

[2]) »Handbuch«, VIII. Aufl. 1909.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. 30, 311 (1900).

lischen Phenolphtaleïnlösung hinzu und läßt aus einer Bürette unter stetem Umrühren $^1/_{10}$ n-Alkalilauge zufließen, bis ein leichtes, aber deutlich erkennbares Rot während $^1/_2$ Minute bestehen bleibt. Der Vergleich mit einer danebenstehenden, ebenso verdünnten und mit der gleichen Indikatormenge versetzten Portion desselben Harns erleichtert das Erkennen der Endreaktion. — Die verbrauchte Menge $^1/_{10}$ n-Alkalilauge gibt die Acidität an, die man auf Salzsäure auszurechnen pflegt. Sie betrage für 10 ccm Harn 2,6 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH = 2,6 × 0,00365 = 0,00949 g HCl. Die Acidität für die Tagesmenge dieses Harns, zu 1500 ccm angenommen, entspricht demnach 1,45 g Salzsäure[1]).

Die Bestimmung der molekularen Konzentration des Harns.

Nach der Theorie der Lösungen, welche in ihren wesentlichsten Punkten von van t'Hoff entwickelt wurde, zeigen die verschiedenen Stoffe in stark verdünnten Lösungen ein ganz ähnliches Verhalten wie im gasförmigen oder dampfförmigen Zustande, so daß die für Gase gültigen Gesetze von Boyle-Mariotte, Gay-Lussac und Avogadro auch für Lösungen die gleiche Geltung haben. Entsprechend dem durch die Gasteilchen bewirkten Druck, üben auch die gelösten Substanzteilchen einen Druck aus, der sich in den osmotischen Erscheinungen bemerkbar macht und daher osmotischer Druck genannt wird.

Solche Substanzmengen verschiedener Stoffe, welche im Verhältnisse ihrer Molekulargewichte stehen, nennt man äquimolekulare Mengen. Es gilt nun das Gesetz, daß Lösungen, welche in der gleichen Menge des Lösungsmittels äquimolekulare Mengen der verschiedenen Substanzen gelöst enthalten, den gleichen osmotischen Druck ausüben. Im Harne sind nicht nur undissoziierte Moleküle, sondern auch Jonen der gelösten Elektrolyte vorhanden. Der osmotische Druck des Harns ist somit abhängig von der gesamten molekularen Konzentration, also von der Konzentration der undissozierten Moleküle plus derjenigen der vorhandenen Jonen der verschiedenen, im Harne gelösten Substanzen.

Die Niere ist das Hauptorgan für die Regulierung des osmotischen Drucks in unserem gesamten Organismus; eine ihrer Hauptaufgaben dürfte darin bestehen, aus einer verhältnismäßig verdünnten Flüssigkeit, dem Blute, eine relativ konzentrierte, den Harn, zu bilden. Dies ist eine Folge davon, daß die natürlichen Stoffwechselprodukte, also die Endprodukte des tierischen Stoffwechsels, welche als Auswurfstoffe durch die Niere ausgeschieden werden und in den Harn übergehen, ein verhältnismäßig geringes Molekulargewicht haben, während die als Nährstoffe für den tierischen Organismus dienenden organischen Substanzen ein sehr hohes Molekulargewicht besitzen. Der osmotische Druck des Harns ist

[1]) Soviel beträgt also die Menge der Säureäquivalente mehr als die Menge der Basenäquivalente für den Tagesharn von 1500 ccm: 150 × 0,00949 = 1,45 (abgerundet).

in der Regel, wenigstens unter normalen Verhältnissen, höher als derjenige des Blutes. — Die Schwankungen, welche in der molekularen Konzentration des Harns und somit auch im osmotischen Drucke des letzteren vorkommen können, sind außerordentlich groß und durch äußere Umstände bedingt z. B. abhängig von der Menge Wasser, welche dem Organismus zugeführt wird, wie auch von derjenigen, die den Organismus auf anderen Wegen als auf dem durch die Niere verläßt oder die in ihm zurückgehalten wird. Auch der Zustand der Niere kommt hierbei in Betracht.

Nach der Theorie der verdünnten Lösungen sind der osmotische Druck, die Erhöhung des Siedepunktes, die Erniedrigung des Dampfdrucks (Dampfspannung) und die Erniedrigung des Gefrierpunktes eines Lösungsmittels direkt proportional der Gesamtkonzentration an gelösten Molekülen und Jonen. Für die Bestimmung der molekularen Konzentration des Harns kommt praktisch nur die Bestimmung des Gefrierpunktes des Harns in Betracht. Die Erniedrigung des Gefrierpunktes eines krystallisierbaren Lösungsmittel wie Wasser ist proportional der Menge Substanz, die in ihm gelöst ist, also der Konzentration, d. h. je mehr feste Substanz gelöst ist, um so größer ist die Erniedrigung des Gefrierpunktes. Da im Harne nicht dissozierte Moleküle sowie Jonen von Elektrolyten gelöst sind und beide Arten von Substanzteilchen einen Einfluß auf den osmotischen Druck und somit in gleicher Weise auch auf die Erniedrigung des Gefrierpunktes des Wassers ausüben, so ist diese Erniedrigung proportional der Gesamtkonzentration der gelösten Substanzen an Molekülen und Jonen, und zwar unabhängig von der Natur der im Harn gelösten Substanzen. — Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß wenn beispielsweise eine wässerige Lösung einen Gefrierpunkt von -1^0, eine andere einen solchen von $-0{,}5^0$, die erstere Lösung den doppelten osmotischen Druck besitzt wie die letztere.

Bezeichnet Δ die Gefrierpunktserniedrigung, welche von n-Grammmolekülen in 100 g Lösungsmittel hervorgebracht wird, so zeigt der Quotient $\frac{\Delta}{n}$ die Erniedrigung an für 1-Grammolekül in 100 g Lösungsmittel. Dieser Wert ist für ein bestimmtes Lösungsmittel eine Konstante $= K$. Somit gilt die Gleichung

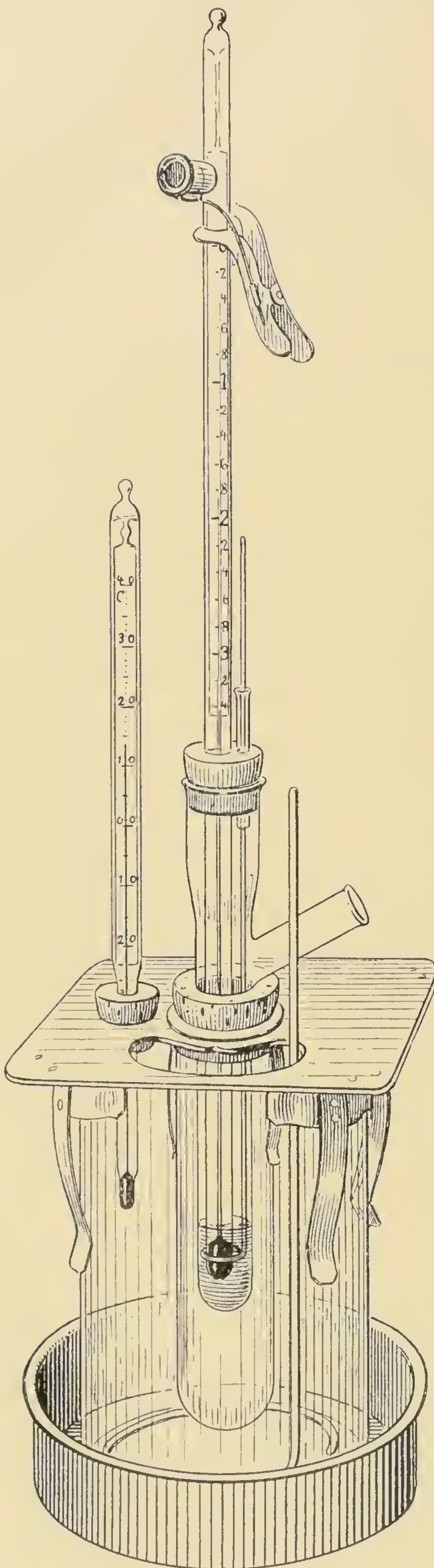
$$\frac{\Delta}{n} = K \text{ und hieraus folgt } \Delta = K.\, n.$$

Für Wasser ist $K = 18{,}5$.

Die Gefrierpunktsbestimmungen des Harns werden meist mit Hilfe des Beckmann'schen Apparates vorgenommen (Fig. 1) [1]. Das Kühlglas, meist ein Batterieglas, dient zur Aufnahme einer Kältemischung

[1]) Ein von Heidenhain geänderter Beckmann'scher Apparat eignet sich vorzüglich für die Gefrierpunktsbestimmung des Harns. Vgl. H. Sahli, »Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden«, V. Aufl. 1909. Der betreffende Apparat kann von R. Götze in Leipzig, Härtelstraße 4, bezogen werden.

Fig. 1



und trägt einen Metalldeckel, der mit drei Oeffnungen versehen ist, und zwar zur Aufnahme eines Rührers (Drahtschleife) für die Kältemischung, ferner eines Thermometers und eines weiteren Reagensglases, welches als Luftmantel für das kleinere Probierrohr, dem eigentlichen Gefriergefäß für die zu untersuchende Lösung, dient; das Gefriergefäß ist mittels eines durchbohrten Korkes in dem weiteren Reagensglase, dem Luftmantel, befestigt und hat einen seitlichen Ansatz, durch welchen zum »Einimpfen« ein Stückchen Eis geschoben werden kann. In dem Gefriergefäße ist, ebenfalls mittels eines durchbohrten Korkes, das Thermometer, — zweckmäßig nehme man ein Beckmann-Thermometer — befestigt; ferner läuft durch einen angebrachten Schlitz des Korks ein als Rührer dienender Platindraht oder Glasstab. Der wesentlichste Bestandteil des Apparats ist das Beckmann-Thermometer, welches in Hundertstelgrade eingeteilt ist. Dasselbe besitzt keinen bestimmten Nullpunkt, so daß es nicht nur für rein wässerige Lösungen wie Harn, sondern auch für andere Lösungsmittel von ganz verschiedenen Gefrierpunkte gebraucht werden kann. Durch eine besondere Einrichtung, nämlich durch eine am oberen Ende des Thermometers angebrachtes Quecksilberreservoir, kann die Quecksilberfüllung des Thermometers vermehrt oder vermindert werden, so daß jeweils der Gefrierpunkt des betreffenden Lösungsmittels in das Bereich der Skala fällt. Es wird nun zunächst der Gefrierpunkt des reinen Lösungsmittels, bei Harnuntersuchungen von reinstem, frisch destilliertem Wasser, und sodann derjenige von der Lö-

sung, also von Harn, bestimmt.

Vor jeder Bestimmung überzeuge man sich davon, daß nicht etwa abgetrennte Quecksilbertröpfchen an der Wand der am oberen Ende des Thermometers befindlichen Erweiterung haften, denn, andernfalls würde die Bestimmung durch diese Ausschaltung eines Teiles der Quecksilberfüllung fehlerhaft werden. Man sieht also vor jeder Gefrierpunktsbestimmung mit einer Lupe das obere Reservoir des Thermometers nach; falls sich abgetrennte Quecksilberteilchen vorfinden, vereinigt man dieselben mit der Quecksilbersäule entweder durch geeignetes Schütteln oder durch vorsichtiges Erwärmen.

Ausführung der Gefrierpunktsbestimmung. Die Bestimmung des Gefrierpunktes einer Lösung, also von Harn, wird genau in der gleichen Weise ausgeführt wie diejenige des reinen Lösungsmittels, des Wassers. Man füllt zunächst das Kühlglas mit einer Kältemischung; nach Hamburger[1]) nehme man ein Gemisch aus 3 Tln. fein zerstoßenem Eis oder Schnee mit 1 Tl. Kochsalz, dem man im Kühlgefäße soviel Wasser zusetzt, daß die Temperatur auf ungefähr —3° fällt. Bei der Untersuchung konzentrierterer Harne mit einem Gefrierpunkt von — 2 bis — 2,7° ist ein Abkühlen des Kühlgefäßes bis auf — 6° notwendig.

Sollte die Temperatur im Verlaufe des Versuchs steigen, so setzt man wieder etwas Eis und Kochsalz in dem angegebenen Verhältnisse zu. Hierauf wird das Gefrierrohr mit der Flüssigkeit, deren Gefrierpunkt man bestimmen will, also mit frisch destilliertem Wasser oder mit Harn, so weit gefüllt, daß nach dem Einführen des Thermometers und Rührers in dieselbe das Quecksilbergefäß des Thermometers von allen Seiten und bis oben hin von der Flüssigkeit umgeben ist; ferner darf das Quecksilbergefäß nirgends die Wand des Gefriergefäßes berühren. Das Gefriergefäß wird dann mit seinem Luftmantel in das Kühlgefäß eingehängt. Durch ruhiges ununterbrochenes Rühren während der ganzen Bestimmung und besonders während des Ablesens wird die Flüssigkeit im Gefriergefäße in fortwährender Bewegung gehalten. Das Quecksilber im Thermometer beginnt alsbald zu sinken, sinkt weiter unter den Gefrierpunkt, Unterkühlung, fängt aber dann plötzlich an zu steigen und bleibt dann bei einem bestimmten Punkte während längerer Zeit stehen. Dieser konstant bleibende Punkt entspricht dem Gefrierpunkte der untersuchten Flüssigkeit; er wird abgelesen und notiert. Wartet man noch länger, so bilden sich Eisnadeln in der Flüssigkeit und allmählich friert diese ganz durch. Von diesem Punkte ab beginnt das Quecksilber wieder zu sinken. Dieses völlige Durchfrierenlassen der Flüssigkeit darf man nicht abwarten. Man wiederholt die Bestimmung noch mindestens zweimal, indem man das Gefriergefäß herausnimmt, das Eis desselben, bis auf einige Kryställchen, durch Erwärmung des Gefäßes mit der Hand zum Schmelzen bringt und dann

[1]) Osmotischer Druck und Jonenlehre. 1902.

wieder, vom Luftmantel umgeben, in das Kühlgefäß eintaucht. Hat man in der beschriebenen Weise mehrere, mindestens drei Bestimmungen unmittelbar nach einander ausgeführt, so legt man für die Berechnung das arithmetrische Mittel der Resultate der verschiedenen Bestimmungen zugrunde. Die Differenz zwischen den Mittelwerten einer Serie übereinstimmender Resultate von reinem Wasser und von Harn gibt die Gefrierpunktserniedrigung Δ des Harns an.

Bemerkungen. Will man richtige Werte für den Gefrierpunkt erhalten, so darf die Lösung im Gefriergefäß nicht zu stark unterkühlt werden, weil sich sonst im Augenblicke des Gefrierens zu große Eismassen bilden und weil dann, da diese aus reinem Wasser bestehen, eine konzentriertere Lösung zurückbleibt, die in Uebereinstimmung mit ihrem höheren osmotischen Drucke, einen zu tiefen Gefrierpunkt gibt. Diesen Fehler einer zu starken Unterkühlung kann man vermeiden, wenn man die Temperatur der Kältemischung im Kühlgefäße nicht zu niedrig wählt, etwa zu —3° C. annimmt. Ein weiteres Mittel, um allzustarke Unterkühlung zu verhindern, besteht darin, daß man im Augenblicke, wo das Quecksilber den Nullpunkt nach unten überschreitet, durch den Ansatz des Gefrierrohres ein winziges Stückchen Eis in die Flüssigkeit herein fallen läßt. Durch dieses Einimpfen von Eiskryställchen wird der Eintritt der Eisbildung beschleunigt und dadurch eine zu starke Unterkühlung vermieden. Damit durch das Impfen von Eisstückchen, nämlich durch Verdünnen der Lösung, keine Fehler im Resultate entstehen, dürfen die Stückchen der Lösung im Gefriergefäße erst dann zugesetzt werden, wenn die Temperatur unter 0° gefallen ist; dann können die Eisstückchen nicht schmelzen und auch nicht eine Verdünnung des Harns herbeiführen.

Die Gefrierpunktserniedrigung für 1 Grammolekül, in 100 g Wasser gelöst, beträgt 18,5° (K.); ist das Grammolekül in 1 Liter = 1000 g Wasser gelöst, so beträgt die konstante Gefrierpunktserniedrigung 1,85°. Die Gasgesetze lehren, daß die Grammoleküle = Molekulargewichte in Grammen ausgedrückt, also 2,02 g Wasserstoff (H_2), 70,9 g Chlor (Cl_2), 32 g Sauerstoff (O_2) und 36,45 g Chlorwasserstoff (HCl-g) unter normalen Bedingungen, nämlich bei 0° und 760 mm = 1 Atmosphäre, den Raum von 22,4 Litern einnehmen. Hieraus folgt, daß die Grammoleküle in einem Raume von 22,4 Liter verteilt, bei 0° einen Druck von einer Atmosphäre ausüben. Ferner besitzen Lösungen, welche in 22,4 Liter ein Grammolekül einer indifferenten Substanz gelöst enthalten, einen osmotischen Druck von einer Atmosphäre. Löst man umgekehrt ein Grammolekül einer Substanz in 1 Liter Wasser, so beträgt der osmotische Druck dieser Lösung 22,4 Atmosphären. Man kann nun leicht aus dem Werte der Gefrierpunktserniedrigung den entsprechenden osmotischen Druck in Atmosphären berechnen, indem man hierbei die beiden Tatsachen in Betracht zieht, daß ein Grammolekül einer Substanz, in 1 Liter Wasser gelöst, einem osmotischen Drucke von 22,4 Atmosphären entspricht und andererseits eine Gefrierpunktserniedrigung

des Wassers von 1,85° hervorbringt. Da sich aber Gefrierpunktserniedrigung und osmotischer Druck proportional ändern, so läßt sich für jede, durch den Versuch gefundenen Gefrierspunkterniedrigung einer wässerigen Lösung wie Harn der zugehörige osmotische Druck in Atmosphären berechnen. Unter normalen Verhältnissen, besonders wenn die Nahrung und die Flüssigkeitszufuhr von normaler Art sind, beträgt die Gefrierpunktserniedrigung des Harns, der von einer gesunden Niere abgesondert wird, mindestens 1,2°, welche nach der Proportion

$$1{,}85 : 22{,}4 = 1{,}2 : x \quad (x = 14{,}5)$$

einem osmotischen Drucke von 14,5 Amtosphären entspricht.

Nach H. Sahli (Klinische Untersuchungs.Methoden) schwankt schon unter normalen Verhältnissen der Gefrierpunkt des Harnes außerordentlich stark. Die Werte der Gefrierpunktserniedrigung wechseln physiologischerweise für den gesammelten Tagesharn zwischen 0,9 und 2,7°. Es sollen aber unter ganz physiologischen Verhältnissen noch weit höhere Schwankungen vorkommen, die in erster Linie von Nahrungs- und Getränkeaufnahme abhängig sind. Bei reichlicher Wasseraufnahme kann sich unter Umständen der Gefrierpunkt des Harns von demjenigen des destillierten Wassers bloß um 0,11° unterscheiden. »Man kann also wohl sagen, es gibt keine Norm für den Gefrierpunkt des normalen menschlichen Harns.« (H. Sahli).

Die Bestandteile des menschlichen Harns.

Im normalen Harn des Menschen sind bis jetzt die folgenden Stoffe bestimmt aufgefunden worden:

Anorganische Stoffe.	Neben Wasser sind es:	Gase:
Salzsäure	Natrium	Stickstoff
Schwefelsäure	Kalium	Kohlensäure
Phosphorsäure	Ammonium	Sauerstoff (fehlt häufig).
Salpetersäure, in Spuren.	Calcium	
Salpetrige Säure.	Magnesium	
	Eisen.	

Organische Stoffe.

a. Stickstofffreie Bestandteile:

Fettsäuren	Benzoesäure, in Spuren
Oxalsäure	p-Oxyphenylessigsäure
Glycerinphosphorsäure	p-Oxyphenylpropionsäure
Aceton, in Spuren (?)	Phenolschwefelsäure
Traubenzucker, in Spuren.	p-Kresolschwefelsäure
Milchzucker, bei Wöchnerinnen.	Inosit

b. Stickstoffhaltige Bestandteile [1]).

Ammoniumsalze von	Harnsäure	Urobilin

[1]) Ob die von Kutscher entdeckten und zuerst aus Menschenharn isolierten organischen Basen Novain, Reduktonovain, Gynesin, Mingin, Vitiatin in jedem Harne normalerweise vorkommen, dürfte noch nicht sicher feststehen.

organischen Säuren
Carbaminsäure
Harnstoff
Kreatin
Kreatinin
Rhodanwasserstoffsäure
Cystin (?)
Histidin (?)
Allantoin
Purinbasen
Glykokoll
Hippursäure
Harnindikan
Indolessigsäure
Harnfarbstoffe:
Urochrom
Uroerythrin
Chondroitinschwefelsäure
Harnmukoid.
Oxyproteinsäure
Antoxyproteinsäure
Alloxyproteinsäure
Uroferrinsäure (?)

Neben diesen normalen Harnbestandteilen kommen unter pathologischen Verhältnissen noch die folgenden Substanzen im Harne vor:

a. Stickstofffreie Bestandteile:

Milchsäure
Aceton (in größerer Menge)
Acetessigsäure
β-Oxybuttersäure
Fett
Cholesterin
Traubenzucker (größere Mengen)
Pentosen (Arabinose)
Linksdrehender Zucker
Homogentisinsäure (Alkapton)

b. Stickstoffhaltige Bestandteile:

Cadaverin
Putrescin
Lecithin
Cystin (größere Mengen)
Leucin
Tyrosin
Eiweißstoffe
Nukleoalbumin
Hämoglobin
Oxyhämoglobin
Methämoglobin
Hämatin
Hämatoporphyrin
Gallenfarbstoffe
Glykocholsäure
Taurocholsäure.

Verhalten des normalen Menschenharns zu einigen wichtigeren Reagenzien.

1. Kalilauge, Natronlauge, wässeriges Ammoniak. Alkalilauge scheidet zunächst weißes, flockiges Calciumphosphat $Ca_3(PO_4)_2$ dann allmählich kristallinisch werdende phosphorsaure Ammoniak-Magnesia $Mg(NH_4)PO_4 . 6H_2O$ aus; beim Aufkochen des mit Alkalilauge versetzten Harns wird Ammoniak frei, nachweisbar am Geruche und mit einem angefeuchteten roten Lackmuspapier. — Ammoniak bewirkt ebenfalls eine weiße flockige Phosphatfällung.
2. Mineralsäuren. Verdünnte Mineralsäuren (10—20%ige) verändern den normalen Harn nicht, wenn sie tropfenweise zugesetzt werden. Derartige, mit verdünnter Salz-, Salpeter- oder Schwefelsäure versetzte Harnproben färben sich aber beim Erwärmen dunkel, mitunter deutlich rot bis rotviolett. — Mit den konzentrierten Mineralsäuren tritt eine mehr oder weniger starke Rotfärbung schon in der Kälte ein.
3. Baryumchlorid fällt einen weißen, aus Baryumsulfat und Baryumphosphat bestehenden Niederschlag, dessen Menge sich

beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure vermindert, indem das Phosphat gelöst wird.

4. Silbernitrat, bei Gegenwart einiger Tropfen verdünnter Salpetersäure, fällt weißes, flockiges Silberchlorid aus. Der Niederschlag ist manchmal durch beigemengten Harnfarbstoff schmutzigweiß oder bräunlich gefärbt.

5. Bleiacetat, neutrales wie basisches (Bleissig), gibt einen reichlichen weißen oder schmutzigweißen bis bräunlich gefärbten Niederschlag, der im wesentlichen aus Bleisulfat, Bleiphosphat und Bleichlorid sowie Harnfarbstoff besteht. Der Harn wird durch den Bleiessigzusatz nahezu vollständig entfärbt, so daß ein farbloses oder nahezu farbloses Filtrat erhalten wird. Die Bleiessigfällung hält aus zuckerhaltigem Harn Zucker zurück, nicht aber die Fällung mit neutralem Bleiacetat, so daß man das letztere verwenden kann, wenn ein Zuckerharn zum Zweck der Polarisation entfärbt werden soll.

6. Ammoniumoxalat fällt weißes kristallinisches, in verdünnter Essigsäure fast unlösliches Calciumoxalat.

7. Natriumkobaltihexanitrit (Kobaltreagens) $[Co(NO_2)_6]Na_3$ fällt aus jedem Harn einen reichlichen orangefarbenen Niederschlag aus, der aus natriumhaltigem Kaliumkobaltinitrit $[Co(NO_2)_6]K_3$ besteht.

8. Uranylacetat fällt einen gelblich-weißen, flockigen, in Essigsäure unlöslichen, in Mineralsäuren leicht löslichen Niederschlag, der aus Uranylphosphat $(UO_2)HPO_4$ und Uranylammoniumphosphat $(UO_2)(NH_4)PO_4$ besteht.

8. Alkohol. Versetzt man normalen Harn mit der 4- bis 6fachen Menge 96%igem Alkohol und schüttelt tüchtig durch, so entsteht je nach der Konzentration des Harns ein mehr oder weniger starker, rötlich weißer Niederschlag, der aus anorganischen Salzen, Harnsäure, Uraten und anderen in Alkohol schwer löslichen Substanzen besteht. Aus einem eiweißhaltigen Harne kann gleichzeitig Eiweiß mit in den Niederschlag übergehen.

9. Kochen. Kocht man normalen, sauer reagierenden Harn, so bleibt er in der Regel vollkommen klar; ist die Acidität des Harns nur gering und ist der Harn gleichzeitig reich an Erdalkaliphosphaten, so kann sich beim Kochen des Harns ein weißer Phosphatniederschlag bilden. Im Unterschied zum Eiweißniederschlag ist der Phosphatniederschlag schon in wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure vollkommen klar löslich.

Anorganische Bestandteile des Harns.

Chlorwasserstoffsäure.

Chlorwasserstoff ist in Form von Chloriden ein normaler

Bestandteil des Menschenharns. Obgleich das Chlor zweifelsohne auf alle im Harne vorkommenden Metalle verteilt ist, dürfte sich doch die größte Menge desselben als Chlornatrium vorfinden. Aus diesem Grunde gibt man die im Harne vorkommende Chlormenge als Chlornatrium an. Diese Angabe ist nicht mehr ganz modern, da ja ein erheblicher Teil der Chloride im Harn in Jonen gespalten ist. — Die mit dem Harne ausgeschiedene Menge an Chloriden ist in erster Linie von der Kochsalzzufuhr abhängig, und zwar ist dies auch bei Krankheiten der Fall. Der Gehalt des Harns an Chloriden unterliegt daher bedeutenden Schwankungen. Von einem erwachsenen gesunden Menschen werden bei gemischter Kost innerhalb 24 Stunden mit dem Harn durchschnittlich 10 bis 15 g Chlornatrium abgeschieden. Ist der Kochsalzgehalt der Nahrung gering und beträgt nur 5 g und weniger pro Tag, Bedingungen, unter welchen ein gesunder Mensch, ohne Schaden zu leiden, ernährt werden kann, so entspricht die tägliche Ausscheidung an Chlornatrium vollkommen der täglichen Zufuhr. Reichliches Wassertrinken steigert die Chlorausscheidung durch die Niere. Wie die anorganischen Chloride können auch organische chlorhaltige Substanzen wie Chloroform und die Trichloressigsäure, nicht aber das Chloralhydrat, die Ausscheidung von anorganisch gebundenem Chlor — von Chlormetallen und ihren Jonen — steigern. Bei Krankheiten, z. B. bei akuten fieberhaften Krankheiten, bei der Pneumonie zur Zeit der Krise, bei der Bildung von Transsudaten und Exsudaten sowie bei starken Diarrhoen kann die Kochsalzausscheidung bedeutend herabgesetzt sein. Bei den angeführten Krankheiten muß die geringe Ausscheidung auf eine Kochsalzretention zurückgeführt werden. Andrerseits können die Chloride bei schneller Resorption flüssiger Transsudate in vermehrter Menge ausgeschieden werden. E. Roos[1]) hat gefunden, daß durch Verfütterung von Schilddrüsensubstanz (Thyreoidea) beim gesunden Hund sowie nach Exstirpation der Schilddrüse, bei gleichbleibendem Futter, die Chlorausscheidung gesteigert wird. Bei einem Hunde betrug die tägliche Kochsalzausfuhr durchschnittlich 0,968 g NaCl, nach Darreichung von 6 g getrockneter Thyreoidea in den darauf folgenden fünf Tagen durchschnittlich 1,192 g NaCl. Nach Verabreichung von Kaliumsalzen hat Bunge eine erheblichere Vermehrung der Chlorausscheidung beobachtet.

Die Chlorausscheidung durch den Harn steht in naher Beziehung zur Verdauung und zwar in dem Sinne, daß nach den Mahlzeiten ein Maximum der Chlorausscheidung eintritt, welchem eine tiefe, mehrere Stunden anhaltende Senkung folgt; die letztere wird dann wiederum von einer Steigerung abgelöst, die durch eine darauffolgende Mahlzeit selbstverständlich noch erhöht wird. Die erste Steigerung der Chlorausscheidung rührt von der Resorption der aufgenommenen Chlormetalle vom Magen aus her, die darauf folgende Senkung entspricht dem Verbrauche des Blutes an Chlornatrium für

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 21, 25 (1895).

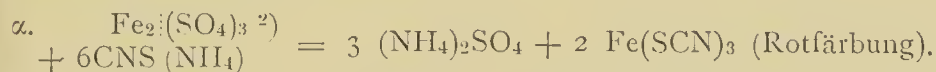
die Salzsäurebildung des Magensaftes und die abermalige Steigerung entspricht der Resorption von Chlormetall (NaCl) vom Darmtraktus aus. Bei gewissen Erkrankungen des Magens, bei Magenkrebs und Achylie, fehlt die durch die Salzsäureproduktion hervorgerufene Senkung. — Bemerkenswert ist, daß nach dem Abendessen, auch beim gesunden Menschen, die Steigerung der Chlorausscheidung ausbleibt; doch ist die regelmäßige Senkung auch hier wahrzunehmen. (A. Müller und Paul Saxl)[1].

Die direkte Bestimmung des Chlors im Harn nach Volhard.

Diese Bestimmung wird fast immer nach der J. Volhar d'schen Restmethode ausgeführt, indem man das Chlor des Harns, bei Gegenwart von Salpetersäure, mit einem Ueberschusse von $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung ausfällt und den Ueberschuß des letzteren unter Zusatz von Eisenalaunlösung als Indikator mit einer $^1/_{10}$ n-Rhodanlösung zurückmißt.

Erfordernisse. 1. $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung. Eine Lösung von 16,99 g reinem Silbernitrat auf 1 Liter Wasser gelöst. 1000 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitrat = 5,85 g NaCl = 3,545 g Chlor. 2. $^1/_{10}$ n-Rhodanammoniumlösung. Man löst 7,5 bis 8 g Rhodanammonium in 1 Liter Wasser und stellt diese Lösung so ein, daß 1 ccm derselben genau 1 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung ausfällt. — 3. Eisenalaunlösung. Eine kalt gesättigte, wässerige Lösung von chlorfreiem Eisenalaun $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. 1 Tl. Eisenalaun löst sich in etwa 3 Tln. Wasser. — 4. Chlorfreie Salpetersäure von 1,20 spez. Gew.; es ist wünschenswert, daß die Säure nicht mehr als Spuren von salpetriger Säure enthält.

Titerstellung der Rhodanammoniumlösung. Man mißt 20 ccm der $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung ab, fügt 2 ccm Eisenalaunlösung (3) und soviel von der Salpetersäure (4) hinzu, daß das Gemisch farblos oder nahezu farblos erscheint, und läßt nun aus einer Bürette die Rhodanlösung (2) tropfenweise zufließen. Jeder einfallende Tropfen der Rhodanlösung erzeugt eine blutrote Färbung von Ferrirhodanid (α), die beim Umschütteln sofort wieder verschwindet (Reaktion β). Ist aber alles Silber als Silberrhodanid ausgefällt, so erzeugt ein weiterer Tropfen der Rhodanlösung eine bleibende, lichtbräunliche Färbung, die das Ende der Titration anzeigt. Man hat schließlich die hergestellte Rhodanammoniumlösung in dem Verhältnisse mit Wasser zu verdünnen, daß sich gleiche Volumina derselben und der $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung entsprechen, daß also beispielsweise 20 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung genau durch 20 ccm der Rhodanlösung vollständig ausgefällt werden.


α. $Fe_2(SO_4)_3$ [2] $+ 6CNS(NH_4) = 3\,(NH_4)_2SO_4 + 2\,Fe(SCN)_3$ (Rotfärbung).


β. $Fe(SCN)_3 + 3NO_3Ag = Fe(NO_3)_3 + 3\,AgSCN$ (Entfärbung und Bildung eines weißen Niederschlags)

[1]) Centralblatt für Physiologie 17, 497 (1903).

[2]) Eisenalaun, $2Fe(NH_4)2(SO_4)2 + 12H_2O$, kann auch geschrieben werden $Fe_2(SO_4)3 + (NH_4)2SO_4 + 24H_2O$. Das Ammoniumsulfat bleibt bei dieser Reaktion unverändert.

Ausführung im Harn. Man bringt in ein 100 ccm Meßkölbchen 10 ccm Harn, ca. 50 ccm Wasser sowie 4 ccm der Salpetersäure von 1,20 spez. Gew., läßt aus einer Bürette 30 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung[1]) zufließen, schüttelt um, füllt mit Wasser bis zur Marke 100 auf und schüttelt abermals gut durch. Nachdem sich der Niederschlag etwas abgesetzt hat, filtriert man 50 ccm = 5 ccm des ursprünglichen Harns durch ein trockenes Filter in ein trockenes Meßkölbchen ab, gießt dieses Filtrat unter Nachspülen des Meßkölbchens in eine geräumige Kochflasche und fügt 5 ccm der Eisenalaunlösung hinzu. Man läßt jetzt aus einer Bürette die $^1/_{10}$ n-Rhodanammoniumlösung tropfenweise zufließen, bis das Gemisch nach dem Umschwenken eine bleibende, schwach rötlichbraune oder lichtbräunliche Färbung angenommen hat.

Beispiel. Beim Zurückmessen der überschüssigen $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung werden 4,6 ccm $^1/_{10}$ n-Rhodanlösung verbraucht. 15 — 4,6 = 10,4 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung sind somit vom Chlor von 5 ccm Harn gebunden, die nach den obigen Angaben 10,4 $\times$ 0,005 85 = 0,060 84 g NaCl entsprechen. Die Tagesmenge dieses Harns, zu 1500 ccm angenommen, enthält demnach 300 $\times$ 0,060 84 = 18,252 g NaCl.

Bemerkungen. Ein Harn, in welchem das Chlor nach dem angegebenen Verfahren bestimmt werden soll, kann Eiweiß, Albumosen und Zucker, aber keine salpetrige Säure enthalten, weil diese die Rhodanwasserstoffsäure bereits in der Kälte oxydiert. Beim Ansäuern des verdünnten Harns mit Salpetersäure kann es vorkommen, daß eine Rotfärbung auftritt, wodurch das Erkennen der Endreaktion mehr oder weniger erschwert wird. C. Arnold[2]) empfiehlt in einem solchen Falle einen Zusatz von einigen Tropfen Kaliumpermanganatlösung. Man bringt dann in das 100 ccm-Meßkölbchen 10 ccm Harn, 30 Tropfen der Salpetersäure von 1,2 spez. Gew., 2 ccm Eisenalaunlösung, sowie, falls es nötig erscheint, tropfenweise eine 8—10%ige Kaliumpermanganatlösung, bis deren Färbung nicht mehr verschwindet und der Harn dadurch hell weißgelb geworden ist. Man läßt dann 30 ccm[3]) der $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung zerfließen, füllt mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt um, filtriert 50 ccm durch ein trockenes Filter in ein trockenes 50 ccm-Meßkölbchen und bestimmt in diesem Filtrat = 5 ccm ursprünglicher Harn den Ueberschuß an $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung nach den obigen Angaben.

Die direkte Titrierung des Chlors im Harn nach Mohr kann nicht empfohlen werden, weil die Endreaktion, auch bei starker Verdünnung des Harns mit Wasser, nur schwer zu erkennen ist. Andrerseits gehen außer Chlor auch andere Harnbestandteile in den Silberniederschlag über wie Harnsäure, Xanthinstoffe, unterschwefligsaure Salze, Farbstoffe, wodurch selbstverständlich die Bestimmung ein mehr oder weniger unrichtiges Resultat liefert. Dagegen gibt die Mohrsche direkte Titrierung des Chlors zufriedenstellende Bestimmungen, wenn der Harn nach der folgenden Methode zuvor verascht wird.

---

[1]) Es wird vielfach auch mit einer Silbernitratlösung gearbeitet, welche im Liter 29,042 g reines Silbernitrat gelöst enthält und von welcher 1 ccm 0,01 g NaCl entspricht.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 81 (1881).

[3]) Für konzentrierte, voraussichtlich chlorreichere Harne nehme man auf 10 ccm des Harns 40 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung.

Die Bestimmung des Chlors nach Mohr nach vorausgegangener Veraschung des Harns.

Diese Methode der Bestimmung des Chlors kann besonders dann empfohlen werden, wenn der Harn eiweißreich oder sehr stark gefärbt ist, so daß die von C. Arnold empfohlene Entfärbung mit Kaliumpermanganat nicht zum Ziele führt. Nach der Veraschung wird das Chlor direkt mit 1/10 n-Silbernitratlösung titriert und zwar bei Gegenwart von neutralem Kaliumchromat als Indikator. Erst wenn alles Chlor der betreffenden Lösung der Harnasche als Silberchlorid ausgefällt ist, entsteht chromsaures Silber Ag_2CrO_4, das dem Niederschlage eine rötliche Färbung erteilt. Die Titration kann nur in neutraler oder ganz schwach saurer Lösung ausgeführt werden.

Ausführung. Man dampft in einer Platinschale 10 ccm Harn[1]) auf dem Wasserbade ein, versetzt den Rückstand mit ungefähr 1 g chlorfreiem Natriumkarbonat (Salkowski) sowie mit 2 bis 3 g chlorfreiem Kaliumnitrat und erhitzt nun über freier Flamme vorsichtig, zunächst nur gelinde, dann stärker bis zum Zusammenschmelzen der ganzen Masse und bis alle Kohlenteilchen entfernt sind. Da die Alkalichloride bei stärkerem Glühen flüchtig sind, vermeide man allzu langes und zu starkes Glühen. Man löst nun die erkaltete Schmelze in heißem Wasser, filtriert die Lösung durch ein aschenfreies Filter, säuert das Filtrat mit chlorfreier Salpetersäure schwach an, neutralisiert wieder mit kohlensaurem Calcium, das auch im geringen Ueberschuß vorhanden sein kann, und fügt einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von neutralem Kaliumchromat zu. Nun läßt man aus einer Bürette 1/10 n-Silbernitratlösung unter Umrühren oder Umschwenken so lange vorsichtig zufließen, bis der Silberchloridniederschlag eine ganz schwache, bleibende Rotfärbung angenommen hat. Dies ist das Ende der Titration. — Berechnung. 1000 ccm 1/10 n-Silbernitrat = 5,845 g NaCl oder 3,545 g Cl oder 1 ccm 1/10 n-Silbernitrat = 5,845 mg NaCl = 3,545 mg Cl.

Bemerkungen. Den Einfluß des Verdauungsprozesses auf die Chlorausscheidung durch den Harn ersieht man recht deutlich aus der folgenden Versuchsreihe; der Harn eines gesunden jüngeren Mannes enthielt:

Kurz vor der Mahlzeit	(1 Uhr)	: 1,48% NaCl,	
1/2 Stunde nach » »	(1 1/2 Uhr)	: 1,70 » »	; Steigerung
2 Stunden » » »	(3 Uhr)	: 1,57 » »	; Senkung
3 » » » »	(4 Uhr)	: 1,32 » »	; Senkung
4 1/2 » » » »	(5 1/2 Uhr)	: 1,73 » »	; Steigerung.

Während dieser Versuchszeit wurden keine Speisen und Getränke eingenommen, und auch jedwede körperliche Anstrengung wurde vermieden. Wie aus dem hohen Kochsalzgehalt zu ersehen ist, war der untersuchte Harn sehr konzentriert; dies hat auch die Bestimmung seines Gefrierpunktes ergeben, der von einer Probe Harn zu $-1,99^0$, von einer zweiten zu $-1,94^0$ ermittelt wurde, was einem osmotischen Drucke von 24,1, bez. 24,5 Atmosphären entspricht.

Bei Gegenwart geringer Mengen Eiweiß kann das Chlor des Harns nach

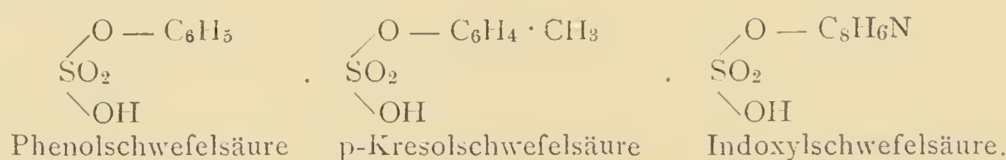
[1]) Bei voraussichtlich chlorreicheren Harnen genügen 5 ccm Harn.

Volhard bestimmt werden, denn ein Harn, der 0,21 bis 0,23 % Eiweiß enthalten hat, lieferte nach Volhard einen Kochsalzwert von 0,81 % und einen solchen von 0,79 %, als der Harn verascht und das Chlor der Asche nach Mohr bestimmt wurde.

Schwefelsäure.

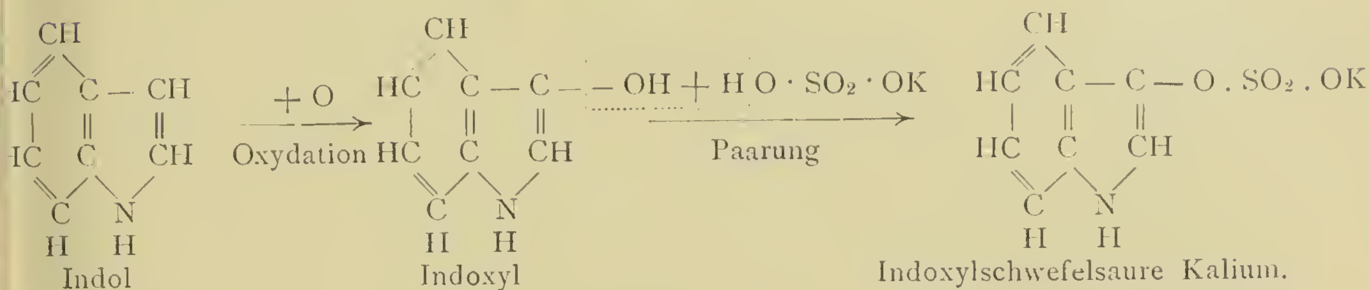
Sulfatschwefelsäure und gepaarte oder Aether-Schwefelsäure.

Schwefelsäure findet sich im Harn des Menschen in zweierlei Form vor, nämlich als Sulfatschwefelsäure, die auch präformierte oder A-Schwefelsäure genannt wird und als Aetherschwefelsäure, das sind die gepaarten aromatischen Schwefelsäuren des Harns. Die erstere Form ist diejenige der schwefelsauren Salze, die also Sulfat-Jonen (SO_4'') bildet, während sich die Aetherschwefelsäuren von der allgemeinen Formel $R - O - SO_2 - OH$ ableiten, wobei R Phenyl C_6H_5, p-Kresyl $C_6H_4(CH_3)$ (1,4) oder Indoxyl C_8H_6N bedeuten soll:



Da unsere Nahrungsmittel nur ganz geringe Mengen von schwefelsauren Salzen enthalten, kann die Schwefelsäure des Harns nur zum kleinsten Teile aus jenen stammen. Bei weitem die größte Menge der im Harne enthaltenen Schwefelsäure muß daher im Organismus selbst gebildet und das schwefelhaltige Eiweiß als die Quelle der Schwefelsäure angesehen werden. Bei der Oxydation des Eiweißes im Organismus wird der Schwefel des letzteren zum allergrößten Teile zu Schwefelsäure oxydiert. Die Ausscheidung der Gesamtschwefelsäure muß daher mit der Menge der im Körper umgesetzten Eiweißstoffe schwanken; sie beträgt bei gemischter Kost für den erwachsenen Menschen und bezogen auf die 24stündige Harnmenge durchschnittlich 2,5 g Schwefelsäure (H_2SO_4). Da die Schwefelsäure des Harns ebenso wie der Stickstoff des letzteren fast ausschließlich aus dem umgesetzten Eiweiß stammt, so muß auch die Schwefelsäureausscheidung der Stickstoffausscheidung ziemlich parallel gehen; in der Tat ist das Verhältnis N : H_2SO_4 ziemlich konstant und fast immer gleich 5 : 1. Dieser annähernde Parallelismus in der Stickstoff- und Schwefelsäureausscheidung besteht sowohl unter normalen wie unter krankhaften Verhältnissen. — Die Aetherschwefelsäure ist im normalen Harn in erheblich geringerer Menge vorhanden wie die Sulfatschwefelsäure; ihre Menge macht beim gesunden Menschen etwa $^1/_{10}$ der Gesamtschwefelsäure aus, ist aber bedeutenden Schwankungen unterworfen, indem sie, auf die 24stündige Harnmenge bezogen, zwischen 0,09 und 0,620 g Schwefelsäure schwankt. Die Menge der gebildeten und mit dem Harne ausgeschiedenen Aetherschwefelsäure ist in erster Linie von der Eiweißfäulnis im Darme abhängig, mit der sie steigt und fällt; je größer die Eiweißfäulnis ist, umso mehr wird

Aetherschwefelsäure ausgeschieden. Bei der Fäulnis im Darme entstehen Phenole, nämlich Phenol und hauptsächlich p-Kresol, ferner Indol und Skatol, welche nach ihrer Resorption als gepaarte Schwefelsäuren in den Harn übergehen; Indol und Skatol müssen hierbei vor ihrer Paarung mit Schwefelsäure bez. saurem schwefelsaurem Kalium erst zu Indoxyl und Skatoxyl oxydiert werden:

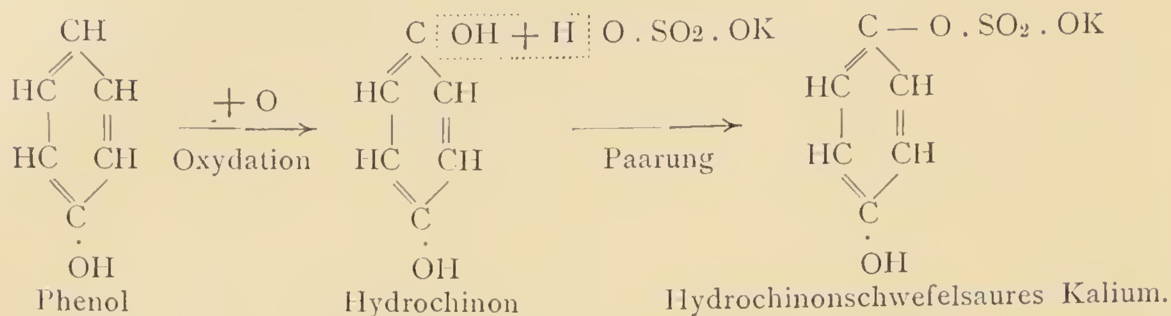


Eine vermehrte Ausscheidung der gepaarten Schwefelsäuren kommt daher unter anderem vor bei lebhafterer Darmfäulnis, bei Stauungen des Darminhaltes, bei der Resorption von Fäulnisprodukten aus eiterigen Geschwüren, bei tuberkulöser Darmentzündung (Enteritis), nicht aber bei einfacher Obstruktion (O. Hammarsten[1]). Auch wenn Fäulnisprozesse außerhalb des Darmes stattfinden, so bei der Resorption von Fäulnispropukten aus eiterigen Geschwüren oder Abszessen anderswo im Körper als im Darme, ist die Menge der gepaarten Schwefelsäure im Harne vermehrt; die letztere nimmt zu mit dem Grade dieser Fäulnis und der Zurückhaltung der faulenden Stoffe, aber ab, wenn eine Entleerung der letzteren erfolgt. Umgekehrt wird selbstverständlich die Menge der Aetherschwefelsäuren herabgesetzt durch alles, was die Eiweißfäulnis im Darme hemmt oder ganz zurückdrängt. In diesem Sinne wirken Milch und Kefir. Schmitz[2]) nimmt für das Caseïn eine fäulnishemmende Wirkung an, während Winternitz diese Wirkung dem Milchzucker zuschreibt. Von Arzneimitteln, welche durch ihre fäulniswidrige Wirkung die Ausscheidung der Aetherschwefelsäuren vermindern, haben sich Calomel, Kampfer und Terpentinöl als wirksam erwiesen. — Andrerseits ist die Menge der mit dem Harne ausgeschiedenen Aetherschwefelsäure vermehrt, wenn innerlich Arzneimittel dargereicht werden, welche, eventuell nach vorausgegangener Oxydation oder Hydrolyse, als gepaarte Schwefelsäuren ausgeschieden werden. Zu derartigen Arzneistoffen gehören die Phenole, wie Carbolsäure, die Kresole, Guajakol und Guajakalderivate, ferner Acetanilid und Phenacetin. Interessant ist die Tatsache, daß aromatische Stoffe, welche bereits eine Hydroxylgruppe enthalten und daher bereits zur Bildung von Aetherschwefelsäuren geeignet sind, vor der Paarung zum Teil erst oxydiert werden. So wird Phenol teilweise als Phenolschwefelsäure ausgeschieden, zum Teil aber wird es erst zu Hydro-

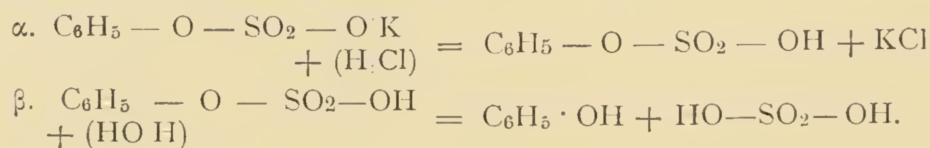
---

[1]) Physiologische Chemie VII. Aufl. 1910.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 385 (1894).

chinon oxydiert und dieses als hydroninonschwefelsaures Kalium ausgeschieden. (E. Baumann):



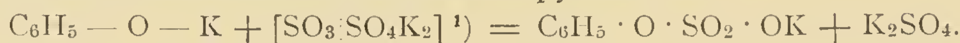
Die Alkalisalze der gepaarten Schwefelsäuren kristallisieren gut, meist in weißen, perlmutterglänzenden, in Wasser und in siedendem Alkohol ziemlich leicht löslichen Blättchen. Beim Kochen mit Salzsäure werden die zunächst aus ihren Alkalisalzen frei gemachten gepaarten Schwefelsäuren sofort in Schwefelsäure und die entsprechenden Phenole hydrolytisch gespalten:



$$\alpha.\quad C_6H_5 - O - SO_2 - OK + (HCl) = C_6H_5 - O - SO_2 - OH + KCl$$

$$\beta.\quad C_6H_5 - O - SO_2 - OH + (HOH) = C_6H_5 \cdot OH + HO - SO_2 - OH.$$

E. Baumann hat die Alkalisalze der gepaarten Schwefelsäuren künstlich dargestellt, z. B. phenolschwefelsaures Kalium erhalten durch Erhitzen von Phenolkalium mit Kaliumpyrosulfat:



$$C_6H_5 - O - K + [SO_3 SO_4K_2]\,^{1)} = C_6H_5 \cdot O \cdot SO_2 \cdot OK + K_2SO_4.$$

Die Bestimmung der Gesamtschwefelsäure des Harns nach E. Baumann.

Zur Bestimmung der Gesamtschwefelsäure muß die im Harn vorhandene gepaarte Schwefelsäure durch Kochen mit Salzsäure erst hydrolytisch gespalten, dann die gesamte Schwefelsäure mit Baryumchlorid ausgefällt werden.

Man versetzt in einem Becherglase oder einem Erlenmeyerkolben 100 ccm des filtrierten Harns mit 5 ccm (nicht mehr) konzentrierter Salzsäure (sp. Gew. ca. 1,2 = rauchende Salzsäure mit 37—40% HCl.), kocht auf, hält zur völligen Zerlegung der Aetherschwefelsäuren 15 Minuten im schwachen Sieden, fällt mit Baryumchloridlösung (5% $BaCl^2 + 2H_2O$), die man vorher zum Sieden erhitzt hat, vollständig aus, erwärmt nach 2—3 Stunden auf dem warmen Wasserbade und läßt dann einige Zeit, am besten bis zum anderen Tage, kalt stehen. Auf diese Weise scheidet sich das von der heißen Salzsäure in Lösung gehaltene Baryumsulfat vollständig aus. Nun gießt man die über dem Baryumsulfatniederschlage stehende Flüssigkeit durch ein aschenfreies Filter, rührt den Niederschlag mit heißem Wasser an, läßt wiederum absetzen, gießt die vollständig erkaltete Flüssigkeit durchs Filter und wiederholt das Auswaschen des Niederschlags durch Dekan-

[1]) Kaliumpyrosulfat $K_2S_2O_7$ kann geschrieben werden $[SO_3SO_4K_2]$.

tieren so oft, bis das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure (Prüfung auf $\dot{B}a$) und mit Silbernitrat (Prüfung auf Cl') keinen Niederschlag mehr gibt. Nun bringt man den Niederschlag ohne Verlust aufs Filter, spült ihn zur Entfernung von meist anhaftenden, bräunlich gefärbten, harzigen Stoffen wiederholt mit wenig heißem Alkohol aus, trocknet ihn im Dampftrockenschranke und glüht ihn im offenen tarierten Platin- oder Porzellantiegel etwa 10 Minuten lang. Das vom Niederschlage möglichst befreite Filter wird an einer Platinspirale verascht und die Asche zum Niederschlag gegeben. Die Berechnung geschieht nach der Proportion.

$$BaSO_4 : H_2SO_4 = \text{gewogene Menge } BaSO_4(N) : x$$

$$233{,}46 : 98{,}07 = N : x; \quad \text{hieraus } x = \frac{98{,}07}{233{,}46} N.$$

Da $\frac{98{,}07}{233{,}46} = 0{,}42007$ ist, erfährt man die in den abgemessenen 100 ccm Harn enthaltene Menge Schwefelsäure (H_2SO_4) durch Multiplikation des Gewichts des Baryumsulfatniederschlags (N) mit 0,42007; falls die Schwefelsäure als SO_4'' ausgedrückt werden soll, durch Multiplikation mit 0,41147, da $\frac{SO_4}{SO_4Ba} = 0{,}41147$ ist.

Die Bestimmung der Aetherschwefelsäure des Harns.

1. Nach E. Baumann[1]). Diese Bestimmungsmethode beruht auf der Tatsache, daß aus einem mit Essigsäure angesäuerten Harne durch Baryumchlorid nur die präformierte oder Sulfatschwefelsäure, nicht aber die gepaarte Schwefelsäure gefällt wird. Die letztere findet sich also unter diesen Bedingungen im Filtrate vom erhaltenen Baryumsulfatniederschlage vor, wird dann durch Erhitzen mit Salzsäure hydrolytisch gespalten und für sich bestimmt.

100 ccm Harn werden mit ca. 80 ccm Wasser verdünnt, erst mit 2 bis 3 ccm Essigsäure, dann mit Baryumchlorid im Ueberschusse versetzt und auf dem Wasserbade $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden erwärmt. Man läßt nun abkühlen, bringt das Harngemisch samt Niederschlag ohne Verlust in einen 200 ccm-Meßzylinder und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Nach dem Umschütteln und Absitzenlassen des Niederschlags während einiger Minuten gießt man die Flüssigkeit durch ein trockenes Doppelfilter, wobei ein wiederholtes Zurückgießen der häufig trübe filtrierenden Flüssigkeit meist notwendig ist. Man versetzt 100 ccm des aufgesammelten klaren Filtrats (= 50 ccm ursprünglicher Harn) mit 3 ccm konzentrierter Salzsäure, kocht auf und hält das Gemisch ca. 15 Minuten im schwachen Sieden. Der hierbei sich bildende Baryumsulfatniederschlag enthält die Schwefelsäure der gepaarten Schwefelsäure von 50 ccm des abgemessenen Harns; er wird in der für die Bestimmung der Gesamtschwefelsäure angegebenen Weise weiter verarbeitet.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 70 (1877/78) und Zeitschr. f. analyt. Chem. 17, 122.

2. Nach Salkowski[1]). Man versetzt 100 ccm Harn mit 100 ccm einer Barytmischung, welche aus 2 Volumen einer kalt gesättigten Aetzbarytlösung und 1 Volumen kalt gesättigter Chlorbaryumlösung bereitet ist. Durch die Barytmischung werden die Phosphorsäure und Sulfatschwefelsäure des Harns ausgefällt, während die gepaarte Schwefelsäure in Lösung bleibt. Nach dem Umschütteln filtriert man die Harnbarytmischung durch ein trockenes doppeltes Faltenfilter in ein trockenes Meßkölbchen, säuert 100 ccm des Filtrats = 50 ccm des ursprünglichen Harns mit 10 ccm Salzsäure von 1,12 spez. Gew. stark an, kocht zur Spaltung der gepaarten Schwefelsäure 5—10 Minuten und erwärmt auf dem kochenden Wasserbade noch so lange, bis sich der entstandene Baryumsulfatniederschlag vollständig abgesetzt hat und die darüber stehende Flüssigkeit klar geworden ist. Im übrigen verfährt man nach den Angaben von 1.

Die Bestimmung der Sulfatschwefelsäure.

1. Durch Berechnung. Man bestimmt in einer Harnprobe die Gesamtschwefelsäure und in einer zweiten Probe des gleichen Harns die gepaarte Schwefelsäure nach Salkowski, und zwar rechnet man beide in Prozente als H_2SO_4 oder SO_4'' aus. Zieht man die gepaarte Schwefelsäure von der Gesamtschwefelsäure ab, so erfährt man die Menge an vorhandener Sulfatschwefelsäure, ebenfalls in Prozenten ausgedrückt.

2. Nach E. Baumann. Der Niederschlag, welcher bei der Bestimmung der gepaarten Schwefelsäure nach Baumann aus dem mit Essigsäure angesäuerten Harne mit Baryumchlorid erhalten wird, enthält die ganze Sulfatschwefelsäure des Harns, freilich verunreinigt mit wenig phosphorsaurem Baryum. Um das letztere zu entfernen, muß mit dem geglühten und gewogenen Baryumsulfat eine Reinigung nach Brügelmann in der folgenden Weise vorgenommen werden. Der Niederschlag im Platintiegel wird mit 3 Tropfen konzentrierter Salzsäure — nicht mehr — und einigen ccm Wasser versetzt und die Klümpchen des Niederschlags mit einem dünnen Glasstabe zerteilt, dann wird etwa 2 Minuten lang über ganz kleiner Flamme gelinde erwärmt, ohne daß die Flüssigkeit ins Sieden kommt. Nun wird die im Tiegel über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit durch ein kleineres aschefreies Filter gegossen und die angegebene Operation noch 2 oder 3mal, d. h. so oft wiederholt, bis das Filtrat höchstens noch unwesentliche Spuren von in Salzsäure löslichem Baryumsalz enthält. Schließlich wird das so gereinigte Baryumsulfat auf dem Filterchen gesammelt, getrocknet und in der oben angegebenen Weise geglüht und gewogen. War der erhaltene Baryumsulfatniederschlag noch nicht absolut frei von organischer Substanz, so kann ein Teil des Baryumsulfats reduziert sein. Um diesen Teil des Niederschlags in $BaSO_4$ überzuführen, befeuchtet man den

[1]) Virchows Archiv 79, 532.

Niederschlag mit 2 Tröpfchen mäßig verdünnter Schwefelsäure (1 + 1), verdunstet diese vorsichtig, glüht den Tiegel nochmals und wägt ihn nach dem Erkalten im Exsikkator. Das erhaltene Baryumsulfat wird wie bei der Bestimmung der Gesamtschwefelsäure entweder auf Schwefelsäure (H_2SO_4) oder Sulfat-Jon (SO_4'') umgerechnet.

Der neutrale Schwefel des Harns.

Wie im vorhergehenden Abschnitte dargetan wurde, enthält der Harn des Menschen normalerweise Sulfatschwefelsäure und gepaarte Schwefelsäure. Außerdem finden sich im Menschenharn verschiedene andere schwefelhaltige Substanzen vor, die auch nach dem Kochen mit Salzsäure durch Chlorbaryum nicht ausgefällt werden; Salkowski hat die Gesamtheit dieser letzteren Art schwefelhaltiger Substanzen kurz als »neutralen Schwefel« bezeichnet. Er umfaßt die Rhodanwasserstoffsäure, die Abkömmlinge des Cystins und wahrscheinlich auch der Taurine. Auf den Rhodanwasserstoff soll im allergünstigsten Fall nur etwa $^1/_3$ des Gesamt-Neutralschwefels entfallen.

Die Menge des neutralen Schwefels ist in erster Linie abhängig von der Menge und Qualität der im Körper zerfallenden Eiweißsubstanzen. Die Gruppe der den neutralen Schwefel zusammensetzenden Substanzen stammt sowohl aus dem Nahrungseiweiß — exogene Menge des Neutralschwefels — als auch aus zerfallendem Organeiweiß — endogene Menge des Neutralschwefels (M. Weiß[1]). Das Organeiweiß liefert verhältnismäßig mehr neutralen Schwefel als das Nahrungseiweiß. Die Menge des Neutralschwefels ist absolut und relativ erhöht bei Tuberkulose, am meisten aber bei Carcinom. — Die Substanzen, welche den neutralen Schwefel des Harns ausmachen, zerfallen in leichter oxydierbare Substanzen, deren Schwefel schon durch Chlor oder Brom zu Schwefelsäure oxydiert wird und in schwerer oxydierbare Stoffe, die wie das Taurin zur Oxydation ihres Schwefels mit Salpeter und Soda oder Aetzkali geschmolzen werden müssen. — Als mittlere tägliche Neutralschwefelausscheidung fand Weiß für die Norm bei gemischter Kost beim erwachsenen gesunden Menschen 0,1557 g S, was 16,5 % des Gesamtschwefels des Harns ausmacht.

Nachweis und Bestimmung des „Neutralschwefels“ des Harns.

Nachweis. Man kocht etwa 100 ccm Harn in der für die Bestimmung der Gesamtschwefelsäure (S. 24) angegebenen Weise mit Salzsäure, fällt die Gesamtschwefelsäure in der Siedehitze mit überschüssigem Chlorbaryum vollständig aus, entfernt aus dem klaren Filtrat das in Lösung befindliche Baryum mit Natriumkarbonat im Ueberschusse vollständig, filtriert wiederum ab, dampft das hiebei erhaltene Filtrat zur Trockene ein

[1]) Biochemische Zeitschr. 27, 175 (1910).

und schmilzt den Rückstand in einer Platinschale mit Salpeter zusammen. Die wässerige Lösung der Schmelze wird mit Salzsäure angesäuert, dann mit Baryumchlorid versetzt. Der hierbei sich bildende Baryumsulfatniederschlag enthält die Schwefelsäure, die aus dem neutralen Schwefel hervorgegangen ist.

1. Bestimmung des Neutralschwefels. Unter Oxydation mit Salpeter. Man bestimmt in einer Portion des Harns nach den früheren Angaben die Gesamtschwefelsäure (I) und in einer zweiten Harnmenge die Gesamtschwefelsäure plus Gesamt-Neutralschwefel (II); II minus I ergibt dann die Schwefelsäure des gesamten Neutralschwefels.

Für die Bestimmung II dampft man 50 ccm Harn in einer flachen Schale ein, vermischt den Rückstand mit 4 bis 6 g Kalisalpeter und 2 g Soda oder besser mit 2 bis 3 g aus Metall dargestelltem Aetznatron und schmilzt das Ganze in einer geräumigen Platinschale, in der sich schon etwas geschmolzener Salpeter befindet, zusammen, bis eine weiße Schmelze erhalten wird. Die erkaltete Schmelze löst man in heißem Wasser auf, bringt die Lösung ohne Verlust in eine Porzellanschale, dampft auf dem Wasserbade zur Trockene ein, raucht den Rückstand zur vollständigen Entfernung der Salpetersäure dreimal mit je 10 ccm konzentrierter Salzsäure ab, löst dann in heißem Wasser, filtriert und bestimmt im Filtrat die Schwefelsäure als Baryumsulfat.

2. Bestimmung nach O. Folin. — Oxydation mit Natriumsuperoxyd[1]). Man versetzt in einem Nickeltiegel von 200 bis 250 ccm Inhalt 25 ccm Harn — von einem sehr verdünnten Harn nehme man 50 ccm — mit 3 g Natriumsuperoxyd, dampft erst bis zur Sirupkonsistenz und dann vorsichtig und langsam mit kleiner Flamme zur Trockene ein, so daß die Masse in ungefähr 15 Minuten fest wird. Man läßt erkalten, versetzt den Rückstand erst mit 1 bis 2 ccm Wasser, dann mit 7 g Natriumsuperoxyd und erhitzt nun das Gemisch bis zum vollständigen Schmelzen ungefähr 10 Minuten lang. Nachdem die Schmelze etwas abgekühlt ist, erhitzt man sie mit 100 ccm Wasser ungefähr 1/2 Stunde, um alles unverändert gebliebene Natriumsuperoxyd zu zersetzen, spült dann den Inhalt des Tiegels ohne Verlust mit heißem Wasser in einen »Erlenmeyer« von 400 bis 450 ccm Inhalt und verdünnt schließlich mit Wasser auf etwa 250 ccm. Zu der fast kochenden Lösung fügt man langsam konzentrierte Salzsäure hinzu und zwar ungefähr 18 ccm auf 7 g Natriumsuperoxyd und filtriert nach dem Erkalten ab. Die klare, saure Lösung versetzt man mit 5 ccm verdünntem Alkohol (1 : 4 Wasser), kocht einige Minuten, läßt zu der kochend heißen Lösung tropfenweise 10 ccm Baryumchloridlösung (von 10%) zufließen und läßt vor dem Abfiltrieren des Baryumsulfatniederschlags 2 Tage in der Kälte stehen.

3. Bestimmung nach E. Abderhalden und C. Funk[2]).

[1]) Journ. of Biol. Chem. 1, 131 (1906).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 331 (1908/9) und 59, 121 (1909).

Auch nach dieser Methode wird die Oxydation des Harns mit Natriumsuperoxyd vorgenommen.

10 ccm Harn werden mit wenig Soda und 0,4 g reinem Milchzucker in einem Nickeltiegel[1]) auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird mit Hilfe eines Platinspatels mit Natriumsuperoxyd gut gemischt. Nachdem der Tiegel in einer Porzellanschale in kaltes Wasser eingetaucht ist — das Wasser soll den Tiegel bis zu 3/4 seiner Höhe bedecken — wird sein Inhalt mit einem glühenden Eisennagel entzündet, der durch das im Deckel des Tiegels befindliche Loch eingeführt wird. Nach dem Erkalten wird der Tiegel umgestürzt, die Porzellanschale rasch mit einem Uhrglas bedeckt, und nunmehr der Inhalt der Schale und des Tiegels quantitativ in ein Becherglas übergeführt. Die Flüssigkeit wird mit Salzsäure angesäuert und die Schwefelsäure der abfiltrierten Lösung mit Baryumchlorid ausgefällt und als Baryumsulfat gewogen.

Bemerkungen. Nach diesem Verfahren haben Abderhalden und Funk stets befriedigende Werte erhalten, die mit den nach der Salpetermethode erhaltenen übereinstimmten; es wurden z. B. in 10 ccm Harn gefunden:

a. nach der Natriumsuperoxydmethode 0,0147 g Schwefel

b. nach der Soda-Salpetermethode 0,0148 g Schwefel.

Dieses Verfahren läßt sich zudem rasch ausführen. Die Verbrennung ist eine vollständige, wenn das Eintrocknen des Harns nur auf dem Wasserbade erfolgt und der Rückstand sofort mit Natriumsuperoxyd gemischt wird.

Schwefelwasserstoff.

Schwefelwasserstoff tritt als ziemlich konstanter Bestandteil in den Darmgasen auf und entsteht bei der Fäulnis von Leichenteilen. Im frischen Harn findet er sich sehr selten vor und kommt auch nicht darin vor bei Krankheiten, die mit Fäulnisprozessen verbunden sind. Schwefelwasserstoff und Schwefelalkalien gehen auch nicht als solche in den Harn über, so lange sie nicht in letal wirkenden Dosen verabreicht werden. Schwefelnatrium gelangt zum großen Teil als schwefelsaures Salz zur Ausscheidung. Nach Angabe verschiedener Autoren soll sich Schwefelwasserstoff infolge einer Gärung schon innerhalb der Harnblase bilden können (von Jaksch[2]). Außerhalb des Organismus entwickelt ein in Fäulnis übergegangener Harn häufig Schwefelwasserstoff. Der Harn bleibt hier zunächst sauer, nimmt aber später eine alkalische Reaktion an. Es sind verschiedene Bakterien beschrieben, welche Harn in Schwefelwasserstoffgärung versetzen können.

Man erkennt Schwefelwasserstoff meist schon an seinem Geruche sowie mit Hilfe eines »Bleipapiers«, das sich schwärzt. Man füllt zu dem Zweck ein Kölbchen zur Hälfte mit dem fraglichen Harn und befestigt mittels eines Korks einen Streifen Filtrierpapier, der mit Blei-

[1]) Ein für derartige Bestimmungen geeigneter Nickeltiegel kann von der Firma F. Köhler in Leipzig bezogen werden.

[2]) Klinische Diagnostik, IV. Aufl. 1896, 458.

acetatlösung befeuchtet ist, so daß der Streifen die Wand des Kölbchens nicht berührt. Ebenso färbt sich ein mit Nitroprussidnatriumlösung und mit Natronlauge befeuchteter Papierstreifen purpurrot, wenn er einer schwefelwasserstoffhaltigen Atmosphäre ausgesetzt wird. — Spuren von Schwefelwasserstoff werden noch erkannt, wenn man den betreffenden Harn in einen Kolben bringt, diesen mit einem zweiten Kölbchen, welches alkalische Bleioxydlösung, nämlich Bleiacetatlösung + überschüssige Natronlauge, enthält, in Verbindung setzt und nun mittelst der Wasserstrahlpumpe Luft hindurchsaugt, die vorher durch Kalilauge gewaschen wird. Enthält der Harn selbst nur Spuren von Schwefelwasserstoff, so färbt sich die alkalische Bleioxydlösung durch entstandenes Schwefelblei schwarz.

Phosphorsäure.

Die Phosphorsäure gehört zu den normalen Bestandteilen des Menschenharns; sie kommt im sauer reagierenden Harne als zweifach saures Phosphat $PO_4\overset{I}{Me}H_2$ und als einfach saures Salz $PO_4\overset{I}{Me}_2H$ vor. Nach Ott[1]) und nach Lieblein[2]) entfallen von der Gesamtphosphorsäure des Harns 60% auf das zweifach saure und etwa 40% auf das einfach saure phosphorsaure Salz. Es sind aber auch verschiedene Fälle in der Literatur beschrieben, daß die Phosphorsäure im Harn ausschließlich oder fast ausschließlich als zweifach saures Phosphat vorhanden war. Die Gesamtmenge an Phosphorsäure, welche mit dem Harn zur Ausscheidung gelangt, ist außerordentlich schwankend und hängt in erster Linie von der Art, Menge und der Zusammensetzung der Nahrung ab. Bei gemischter Kost werden vom gesunden erwachsenen Menschen in 24 Stunden in Mittel 2,5 g P_2O_5 mit dem Harn ausgeschieden, und zwar mit Schwankungen zwischen 1 und 5 g P_2O_5 pro die. Die Hauptmenge der durch die Nieren abgesonderten Menge Phosporsäure stammt von den phosphorsauren Salzen der Nahrung. Die Menge der mit dem Harne ausgeschiedenen Phosphorsäure ist am größten, wenn die Nahrung reich an Alkaliphosphaten und verhältnismäßig arm an Calcium und Magnesium ist. Enthält die Nahrung relativ viel Calcium und Magnesium, so werden die Phosphate dieser beiden Metalle in größerer Menge mit den Faeces ausgeschieden; wenigstens ist dies beim Fleischfresser der Fall. Anders liegen die Verhältnisse beim Menschen, bei welchem die Calcium- und Magnesiumsalze der Nahrung für die Resorption der phosphorsauren Salze nicht ausschlaggebend sind, denn innerlich dargereichtes sekundäres Calciumphosphat $CaHPO_4$ wird vom Menschen in so erheblichem Maße resorbiert, daß ungefähr 70% der aufgenommenen Phosphorsäure im Harn wieder erscheinen. Aber immerhin ist auch beim Menschen die Größe der Phosphorsäureausscheidung

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 1 (1886).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 79 (1894).

durch den Harn nicht nur von der Gesamtmenge der mit der Nahrung aufgenommenen Phosphorsäure, sondern auch von dem gegenseitigen Verhältnisse der Alkalisalze und alkalischen Erden der Nahrung abhängig. Die Menge der mit dem Harn ausgeschiedenen Phosphorsäure hängt ferner von der Größe der Zersetzung von nukleïnhaltigem Gewebe im Körper ab. Dementsprechend sollte bei allen Krankheiten, bei welchen wie bei der Leukämie nukleïnhaltiges Gewebe in reichlicherer Menge zerfällt und bei welchen die Ausscheidung der Purinstoffe infolgedessen gesteigert ist, auch eine vermehrte Phosphorsäureausscheidung zu erwarten sein.

Diese Voraussetzung trifft häufig, aber nicht immer zu, denn es sind Fälle von Leukämie mit herabgesetzter Phosphorsäureausscheidung bekannt geworden, Fälle, bei welchen die Zahl der Leukocyten im Blute sogar sehr stark vermehrt war. Bei diesen Ausnahmen von der Regel dürfte es sich in den meisten Fällen um eine Retention der Phosphorsäure oder eine verspätete Ausscheidung dieser Säure handeln.

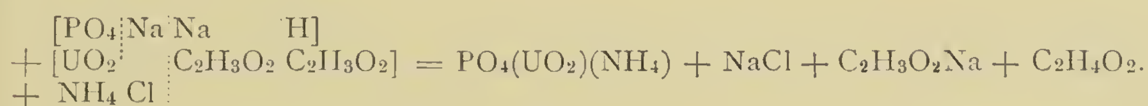
Die Bestimmung der Gesamtphosphorsäure des Harns.

Die Phosphorsäure des Harns wird fast ausschließlich auf maßanalytischem Wege bestimmt, nämlich durch Titration mit einer Uranylacetatlösung von bekanntem Wirkungswerte. In der Wärme wird eine, freie Essigsäure und Natriumacetat enthaltende Lösung eines Phosphats durch Uranylacetat oder ein anderes Uranylsalz als amorphes, flockiges, grünlichgelbes oder grünlichweißes Uranylphosphat $PO_4H(UO_2)$ ausgefällt[1]):



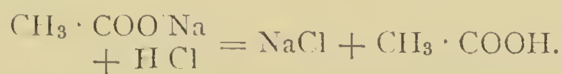
$$\begin{matrix} PO_4H\,Na_2 \\ +\,UO_2\,(C_2H_3O_2)_2 \end{matrix} = PO_4H(UO_2) + 2C_2H_3O_2Na.$$

Sind Ammoniumsalze zugegen, wie dies im Harn immer der Fall ist, so wird die Phosphorsäure auch als Uranylammoniumphosphat ausgefällt:



$$\begin{matrix} [PO_4\,Na\,Na & H] \\ +\,[UO_2\;\;C_2H_3O_2 & C_2H_3O_2] \\ +\,NH_4\,Cl & \end{matrix} = PO_4(UO_2)(NH_4) + NaCl + C_2H_3O_2Na + C_2H_4O_2.$$

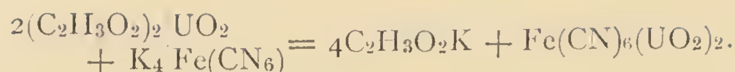
Uranylphosphat und Uranylammoniumphosphat sind in Mineralsäuren löslich, in Essigsäure aber unlöslich. Der Zusatz des Natriumacetats bei der Titrierung der Phosphorsäure bezweckt etwa auftretende freie Mineralsäure zu binden:



$$\begin{matrix} CH_3 \cdot COO\,Na \\ +\,H\,Cl \end{matrix} = NaCl + CH_3 \cdot COOH.$$

Das Ende der Titrierung erkennt man durch eine Tüpfelfarbe mit Ferrocyankaliumlösung; ist alle Phosphorsäure in Form obiger Uranylverbindungen ausgefällt und bereits eine Spur Uranylacetat im Ueberschusse vorhanden, so gibt letzteres mit Ferrocyankalium einen braunroten Niederschlag von Uranylferrocyanid:

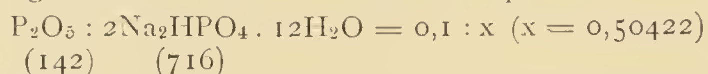
[1]) Das Uranyl $(UO_2)''$ ist wie Sulfuryl $(SO_2)''$ und Chromyl $(CrO_2)''$ ein zweiwertiges Radikal. In den Uranylsalzen ist das Uran (U) sechswertig.



$$\begin{matrix}2(C_2H_3O_2)_2UO_2 \\ + K_4Fe(CN_6)\end{matrix} = 4C_2H_3O_2K + Fe(CN)_6(UO_2)_2.$$

Den gleichen Dienst wie Ferrocyankalium leistet Cochenilletinktur, die mit überschüssiger Uranylacetatlösung einen grünen Niederschlag gibt. Da sich Uranylphosphat und Uranylammoniumphosphat in der Wärme rascher bilden als in der Kälte und auch die Endreaktion schärfer ausfällt, läßt man die Uranylacetatlösung in den fast kochend heißen Harn fließen, den man vorher mit Essigsäure-Natriumacetatgemisch versetzt hat.

Erfordernisse. 1. Eine Uranylacetatlösung, von welcher 1 ccm 0,005 g P_2O_5 ausfällt. Man löst 35 g krystallisiertes Uranylacetat $(C_2H_3O_2)_2UO_2 . 2H_2O$ unter Zusatz von wenig Essigsäure in Wasser auf, verdünnt die Lösung mit Wasser zu 1 Liter, läßt einige Stunden absitzen und filtriert sie ab. Von der klaren Lösung ermittelt man den Titer (s. unten) und verdünnt sie, falls es nötig sein sollte, so, daß 20 ccm der Uranylacetatlösung genau 0.1 g P_2O_5 entsprechen; dann zeigt 1 ccm derselben 0,005 g P_2O_5 an. 2. Eine Natriumphosphatlösung, von welcher 50 ccm genau 0,1 g P_2O_5 enthalten. Nach der Proportion



$$\underset{(142)}{P_2O_5} : \underset{(716)}{2Na_2HPO_4 . 12H_2O} = 0,1 : x \quad (x = 0,50422)$$

müssen in 50 ccm der Natriumphosphatlösung 0,50422 g $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ gelöst sein, oder 1 Liter der wässerigen Lösung enthält 10,0845 g reines, nicht verwittertes Dinatriumphosphat gelöst. 3. Essigsäure-Natriumacetatmischung Man löst in einem 1-Litermeßgefäß 100 g krystallisiertes Natriumacetat $C_2H_3O_2Na + 3H_2O$ in 100 ccm verdünnter zirka 30%iger Essigsäure und füllt dann mit Wasser bis zur Marke auf. 4. Cochenilletinktur, wird bereitet durch Ausziehen einiger Gramm Cochenillekörner mit 250 ccm einer Mischung aus 100 ccm reinem Alkohol und 150 ccm Wasser in der Kälte und Abfiltrieren des Auszuges nach einigen Stunden. Die zurückbleibende Cochenille läßt sich zur Herstellung weiterer Tinktur verwenden. 5. Ferrocyankaliumlösung. Eine wässerige, nicht zu alte, etwa 10%ige Lösung von Ferrocyankalium.

Titerstellung der Uranylacetatlösung. Man bringt 50 ccm der, in einem Meßkölbchen oder einer Bürette abgemessenen Phosphatlösung (2), 5 ccm der Essigsäure-Acetatmischung (3) und 15 bis 20 Tropfen der Cochenilletinktur in einen Kochkolben aus Jenaer Glas, erhitzt zum Sieden und läßt nun aus einer Bürette die Uranlösung so lange zufließen, bis sich das umgeschüttelte und nochmals zum Sieden erhitzte Gemisch dauernd grün färbt. Beim ruhigen Stehenlassen setzt sich die grüne Verbindung des Cochenillefarbstoffes mit dem Uranoxyd zu Boden; dieser Niederschlag soll gerade deutlich grün gefärbt erscheinen; dann ist das Ende der Titration erreicht.

Oder man erwärmt die obige Phosphat-Essigsäure-Acetatmischung ohne Cochenilletinktur in einem Becherglase einige Minuten im siedenden Wasserbade, läßt aus einer Bürette 17 bis 18 ccm der Uranlösung zufließen und bringt nun von dem heißen Gemisch 1 Tropfen zu einem Tröpfchen Ferrocyankaliumlösung, das sich auf einer Porzellanplatte oder einer Glasplatte mit weißer Unterlage befindet. Ist alle Phosphorsäure ausgefällt und eine Spur Uranlösung im Ueberschusse vorhanden, so bildet sich bei dieser Tüpfelfarbe eine bräunlich gefärbte

Trübung oder ein gerade so gefärbter Niederschlag. Hat man diesen Punkt erreicht, so erwärmt man das Gemisch von neuem etwa 2 Minuten im siedenden Wasserbade und wiederholt die Tüpfelfarbe. Fällt auch jetzt noch die Probe positiv aus, so ist die Titration beendigt. Andernfalls muß man wiederum Uranylacetatlösung, von 0,1 zu 0,1 ccm, zufließen lassen, nach jedem Zusatze kurze Zeit im Wasserbade erwärmen und das Zufließenlassen und Erwärmen so oft zu wiederholen, bis die Tüpfelfarbe mit Ferrocyankaliumlösung zu einem positiven Ergebnisse führt. —

Schließlich verdünnt man die hergestellte Uranylacetatlösung mit Wasser in dem Verhältnisse, daß auf 50 ccm der Phosphatlösung genau 20 ccm der Uranlösung erforderlich sind; es entspricht dann 1 ccm der letzteren 0,005 g P_2O_5 oder 0,0067 g PO_4.

Selbstverständlich ist diese genaue Herstellung der Lösung nicht unbedingt notwendig, denn man kann auf Grund der Titerstellung den Wirkungswert der Uranylacetatlösung ausrechnen. Hat man z. B. auf 50 ccm der Phosphatlösung 19,2 ccm Uranlösung verbraucht, so vermögen die letzteren 0,1 g P_2O_5 auszufällen. 1 ccm der hergestellten Uranylacetatlösung entspricht dann 0,1 : 19,2 = 0,00521 g P_2O_5, abgerundet, = Titer der Uranylacetatlösung. Bildet die letztere beim Aufbewahren einen Niederschlag, so muß dieser abfiltriert und der Titer des klaren Filtrats von neuem ermittelt werden.

Die Bestimmung der Gesamt-Phosphorsäure im Harn wird genau in der für die Titerstellung der Uranylacetatlösung angegebenen Weise ausgeführt, nur daß an Stelle der Phosphatlösung 50 ccm des zu untersuchenden Harns abgemessen werden. — Bei stark gefärbten wie bei gallenfarbstoffhaltigen Harnen läßt sich die Endreaktion nur mit Hilfe der Tüpfelfarbe mit Ferrocyankalium feststellen. Ausfällung mit Magnesiamischung. Genauer werden die Resultate, wenn man den Harn (50 ccm) mit überschüssiger Magnesiamischung ausfällt, den Niederschlag nach 12 Stunden abfiltriert, mit einer Mischung aus 1 Vol. Ammoniak (von 10%) und 3 Vol. Wasser auswäscht, in Essigsäure löst, die Lösung mit Wasser auf 50 ccm bringt und die Phosphorsäure derselben, nach Zusatz von 5 ccm Natriumacetatmischung (3) wie den Harn in der Wärme titriert. Neubauer fand so, mit Ferrocyankalium als Indikator, auf die Tagesmenge Harn durchschnittlich 0,15 g P_2O_5 weniger, als beim direkten Titrieren des Harns.

Bemerkungen. Eiweiß oder Zucker im Harn stören die Bestimmung der Phosphorsäure nicht. — Der Titer der Uranlösung ist nicht konstant, denn er wächst mit der verbrauchten Menge. Während bei Verbrauch von 20 ccm 1 ccm Uranlösung 4,98 mg P_2O_5 anzeigt, entspricht 1 ccm der gleichen Lösung 5,14 mg P_2O_5, wenn 40 ccm der Uranlösung verbraucht werden.

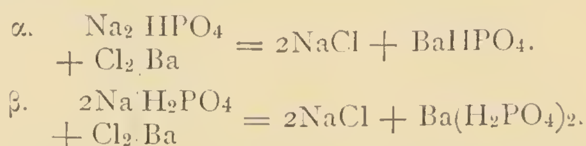
Die Bestimmung des zweifach und des einfach sauren Phosphats im Harn nach E. Freund[1]) und V. Lieblein[2]).

Man bestimmt in einer Probe des Harns die Gesamtphosphor-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 100 (1894).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 66 (1894).

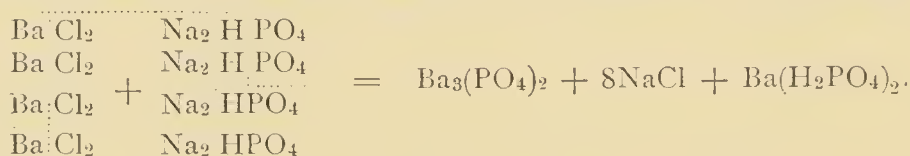
säure durch Titration mit Uranylacetatlösung und in einer zweiten Probe die Phosphorsäure des zweifach sauren Phosphats. — Die Trennung der Phosphorsäure der beiden, in Frage kommenden Arten von Phosphaten beruht auf dem verschiedenen Verhalten derselben gegen Baryumchlorid, durch welches nur die einfach sauren Phosphate als Bariumphosphat $BaHPO_4$ ausgefällt werden (α), während die zweifach sauren phosphorsauren Salze gelöst bleiben (β):



$$\alpha.\quad \begin{matrix} Na_2HPO_4 \\ + Cl_2Ba \end{matrix} = 2NaCl + BaHPO_4.$$

$$\beta.\quad \begin{matrix} 2NaH_2PO_4 \\ + Cl_2Ba \end{matrix} = 2NaCl + Ba(H_2PO_4)_2.$$

Die nach dem Ausfällen des Harns mit Baryumchlorid noch in Lösung befindliche Phosphorsäure wird dann ebenfalls durch Titration mit Uranylacetatlösung bestimmt. Zieht man von der gefundenen Menge der Gesamtphosphorsäure diejenige der zweifach sauren Phosphate ab, so erfährt man die Menge Phosphorsäure der einfach sauren Phosphate. Diese Trennung der einfach sauren von den zweifach sauren Phosphaten mit Baryumchlorid ist nicht genau, weil sich dem einfach sauren Baryumphosphat $BaHPO_4$ auch tertiäres Phosphat $Ba_3(PO_4)_2$ beimengt. Das letztere kann hierbei in der Weise entstehen, daß die in Frage kommende Reaktion teilweise nach der folgenden Gleichung verläuft:



$$\begin{matrix} BaCl_2 \\ BaCl_2 \\ BaCl_2 \\ BaCl_2 \end{matrix} + \begin{matrix} Na_2HPO_4 \\ Na_2HPO_4 \\ Na_2HPO_4 \\ Na_2HPO_4 \end{matrix} = Ba_3(PO_4)_2 + 8NaCl + Ba(H_2PO_4)_2.$$

Neben dem tertiären Phosphat entsteht demnach auch zweifach saures Phosphat $Ba(H_2PO_4)_2$, das in Lösung bleibt; wenigstens dürfte diese Annahme für den sauer reagierenden Harn zutreffen. Man erhält dann mehr Phosphorsäure in Lösung als dem im Harn enthaltenen zweifach sauren Phosphat entspricht. Der Fehler zugunsten des letzteren macht zirka 3 Prozent der Phosphorsäure des einfach sauren Phosphats aus (V. Lieblein).

Ausführung. I. Man bestimmt nach den obigen Angaben in 50 ccm Harn die Gesamtphosphorsäure. — II. In einer zweiten Probe des Harns wird die Phosphorsäure der zweifach sauren Phosphate bestimmt. Zu dem Zweck mißt man in einem Meßzylinder 75 ccm des betreffenden Harns ab, fügt 15 ccm Chlorbaryumlösung (mit 10% $BaCl_2 + 2H_2O$) hinzu, schüttelt um und filtriert 60 ccm = 50 ccm des ursprünglichen Harns durch ein trockenes doppeltes Faltenfilter ab. Ist das Filtrat trübe, so wird es so oft zurückgegossen, bis es vollkommen klar abfließt. In 60 ccm dieses klaren Filtrats wird dann ebenfalls die Phosphorsäure bestimmt = Phosphorsäure der zweifach sauren Phosphate aus 50 ccm Harn. Schließlich hat man 3% der so gefundenen Phosphorsäure abzuziehen und der Phosphorsäure der einfach sauren Phosphate zuzuzählen.

Gesamtphosphorsäure minus zweifach saure Phosphorsäure = »einfachsaure Phosphorsäure«.

Aciditätsbestimmung. V. Lieblein (l. c.) hat gezeigt, daß man durch eine Bestimmung des zweifachsauren Phosphats nach Freund alle sauer reagierenden Bestandteile des Harns bestimmt, indem selbst schwache Säuren wie Essigsäure die Phosphorsäuremenge der zweifach sauren Phosphate proportional der Säuremenge vermehren.

Salpetersäure und salpetrige Säure.

Jeder normale Harn enthält geringe Mengen von salpetersauren Salzen, welche zweifelsohne aus der Nahrung stammen, da ja fast alle natürlichen Wässer und viele Gemüse wie Kohl, Spinat, Salat, Spuren von salpetersauren Salzen enthalten. — Salpetrigsaure Salze kommen im frisch gelassenen Harne allem Anscheine nach nicht vor; sie bilden sich erst beim Stehenlassen des Harns unter dem reduzierenden Einflusse von Mikroorganismen aus salpetersauren Salzen. Von einer großen Zahl unmittelbar nach der Entleerung untersuchter und salpetrigsäurefrei befundener Harne enthielt ungefähr die Hälfte innerhalb der folgenden 24 Stunden salpetrige Säure (Karplus). Die salpetrige Säure entsteht hierbei ausschließlich durch Reduktion der Salpetersäure, nicht aber durch Oxydation des Ammoniaks. Mit Zunahme der Harnfäulnis verschwindet die salpetrige Säure bald wieder aus dem Harn. Verschiedene Organe besitzen die Fähigkeit, Nitrate zu Nitriten zu reduzieren. Andererseits gelangen in nicht zu großer Menge dem Organismus zugeführte Nitrite als Nitrate zur Ausscheidung. So erscheint beim Menschen und Hund nach Eingabe von 1 g Alkalinitrit kein Nitrit, sondern Nitrat im Harn. Erst wenn größere Dosen Nitrit gegeben werden, fällt die Salpetrigsäureprobe im frisch gelassenen Harn positiv aus.

Nachweis der Salpetersäure.

Salpetersäure kann im Harn mit Hilfe der sehr empfindlichen Diphenylamin- und Brucinprobe nachgewiesen werden.

1. Diphenylaminprobe. Man bringt in ein trockenes Reagensglas einige ccm einer Diphenylaminlösung[1]) und schichtet den zu untersuchenden Harn darüber; enthält der Harn Salpetersäure oder salpetrige Säure, so entsteht an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeitsschichten alsbald eine kornblumenblaue Färbung. Diese Probe ist für Salpetersäure nicht charakteristisch, indem sie auch mit chlorsauren Salzen, Eisenoxydsalzen und anderen Oxydationsmitteln eintritt. — G. Goldschmiedt[2]) versetzt den Harn mit einigen Tropfen alkoholischer Diphenylaminlösung und schichtet das Gemisch über reine konzentrierte Schwefelsäure.

---

[1]) Man verwende eine Lösung von 0,5 g Diphenylamin in 100 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von 20 ccm Wasser.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 194 (1910).

2. Brucinprobe. Man versetzt den Harn erst mit dem dreifachen Volumen reiner konzentrierter Schwefelsäure, dann mit 1 ccm der Brucinlösung — 0,2 g Brucin in 100 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure gelöst —; bei Anwesenheit von Salpetersäure im Harn nimmt das Gemisch eine rote Färbung an, die schnell in orange und gelb übergeht.

Weyl destilliert eine größere Menge frischen Harn, 200 ccm mit 30 bis 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure, auf dem Sandbade und untersucht das Destillat mittels Jodkaliumstärkelösung, m-Phenylendiamin sowie mit Sulfanilsäure und α-Naphtylamin auf salpetrige Säure, welche hierbei aus vorhandener Salpetersäure durch die reduzierend wirkenden organischen Stoffe des Harns entsteht.

Nachweis der salpetrigen Säure.

1. Man versetzt den betreffenden Harn mit verdünnter Schwefelsäure, wenig Jodkaliumlösung und gut wirkender Stärkelösung; bei Vorhandensein von salpetriger Säure färbt sich das Gemisch blau.

2. m-Phenylendiaminprobe. Löst man m-Phenyldiamin $C_6H_4(NH_2)_2$ (1,3) in überschüssiger verdünnter Schwefelsäure und fügt einen nitrithaltigen Harn hinzu, so tritt infolge der Bildung eines Azofarbstoffes, nämlich von Bismackbraun oder Triamidoazobenzol, eine gelbe oder gelbbraune Färbung auf. Die Probe ist außerordentlich empfindlich, und es läßt sich die salpetrige Säure mit Hilfe derselben noch bei einer Verdünnung von 1 : 10000000 erkennen.

3. Sulfanilsäure-α-Naphtylaminprobe von P. Grieß[1]). Reagens. 1. Man löst 0,5 g Sulfanilsäure $H_2N \cdot C_6H_4 \cdot SO_2 \cdot OH + 2H_2O$ in 150 ccm einer 30%igen Essigsäure. 2. Man kocht 0,1 g reines, bei 50° schmelzendes α-Naphtylamin $C_{10}H_7 \cdot NH_2$ (α) mit 20 ccm destilliertem Wasser, gießt die farblose Lösung von dem blauvioletten Rückstande ab und vermischt sie mit der Sulfanilsäurelösung. Man füllt die α-Naphtylamin-Sulfanilsäurelösung, in kleinere, gut verschlossene Fläschchen ab.

Versetzt man einen nitrithaltigen Harn mit dem Reagens, so färbt er sich rot. Durch Erwärmen des Gemisches auf 70—80° kann die Empfindlichkeit der Probe erhöht werden. Auch diese Färbung beruht auf der Bildung eines Azofarbstoffes. Die salpetrige Säure führt die Sulfanilsäure in die entsprechende Diazoverbindung über, die sich mit dem α-Naphtylamin zu der intensiv rot gefärbten α-Naphtylaminazobenzolsulfosäure $HO . O_2S . C_6H_4 . N:N . C_{10}H_6 . NH_2$ verbindet. Diese Probe ist außerordentlich empfindlich. Der Gehalt der Luft an salpetriger Säure genügt schon, daß sich die Versuchsflüssigkeit von oben nach unten rot färbt, wenn sie längere Zeit mit der Atmosphäre in Berührung bleibt.

4. Die β-Naphtol-α-Naphtionatprobe[2]). Fügt man zum

---

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 12, 427 (1879).

[2]) Bereitung des Naphtolreagenses. 2 g naphtionsaures Natrium 1,4 - $C_{10}H_6(NH_2)(SO_2ONa)$ + 1 g β-Naphtol werden durch Schütteln in 200 g Wasser gelöst. Die filtrierte Lösung werde im Dunkeln aufbewahrt.

Harn 10 Tropfen »Naphtolreagens« sowie 2 Tropfen konzentrierte Salzsäure und läßt nach dem Umschütteln 20 Tropfen Ammoniak zufließen, so bildet sich an der Berührungsstelle ein rot gefärbter Ring, eventuell färbt sich die ganze Mischung, im durchfallenden Lichte gesehen, rot. Auch hierbei entsteht ein Farbstoff, nämlich ein Oxyazofarbstoff.

5. Seliwanoff'sche Fruktosereaktion. Nitrithaltiger Harn gibt nach R. Adler und O. Adler[1]) die Seliwanoff'sche Fruchtzuckerprobe, d. h. es tritt Rotfärbung ein, wenn man 10 ccm eines nitrithaltigen Harns mit einer Messerspitze voll Resorcin $C_6H_4(OH)_2$ (1,3) und etwa 3 ccm verdünnter Salzsäure kocht. Der bei der Reaktion auftretende Farbstoff läßt sich mit Aether ausschütteln. Fügt man zur ätherischen Lösung wenig Ammoniak, so geht das Rot in Rotviolett über; durch überschüssiges Ammoniak wird aber der Aether entfärbt.

Kalium und Natrium.

Kalium und Natrium finden sich in allen Organen und Flüssigkeiten des Tierkörpers vor und bilden daher einen wesentlichen Bestandteil jeder tierischen Asche. Kalium ist vorzugsweise in der Asche der roten Blutkörperchen, der Muskeln, Nerven, des Harns und der Milch enthalten, während sich Natriumsalze besonders reichlich im Blutplasma, Harn, Pankreassekret, in der Galle des Menschen und der Tiere und in serösen Transsudaten vorfinden.

Bei gemischter Kost scheidet ein erwachsener Mensch in der 24-stündigen Harnmenge 2,3 bis 3,9 g Kali (K_2O) und 4,2 bis 7,4 g Natron (Na_2O) aus. Die Mengen der mit dem Harn ausgeschiedenen Alkalimetalle ist somit erheblichen Schwankungen unterworfen und in erster Linie abhängig von der Zufuhr von Kalium und Natrium, also von der Art der Ernährung. Im Hungerzustande sinkt die Ausscheidung der beiden Alkalimetalle mit dem Aufhören der Kochsalzzufuhr; das Verhältnis der beiden Metalle kehrt sich aber um, so daß dann mehr Kalium als Natrium mit dem Harn ausgeschieden wird; auf 1 Tl. Natrium kommen dann 3 Tle. Kalium (Munk). Bei Nahrungsaufnahme stellt sich das normale Verhältnis zwischen Kalium und Natrium wieder ein. Kaliumsalze werden zu einem nicht unwesentlichen Teile (bis 25%) mit den Faeces ausgeschieden. — Salkowski hat gefunden, daß die Kaliumausscheidung im Fieber um das 3—4- und mehrfache steigt, während andrerseits die Natronausscheidung bei sehr hohem Fieber außerordentlich stark sinkt. Nach dem Abfall des Fiebers steigt mit der wieder beginnenden Nahrungsaufnahme die Natronausscheidung oft sehr rasch wieder. Angestrengte Muskeltätigkeit soll die Ausscheidung des Kaliums durch die Niere erhöhen (Munk). Bemerkenswert ist, daß der Harn der typischen Pflanzenfresser erheblich mehr Kali als Natron enthält, ein Verhalten, das seine Erklärung darin findet, daß

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41. 206 (1904).

die Pflanzen, wenigstens die Landpflanzen, sich im Vergleiche zu den Natriumsalzen durch einen Reichtum an Kaliumsalzen auszeichnen.

Gleichzeitige Bestimmung von Kalium und Natrium im Harn.

[1]) Nach Pribram und Gregor[1]). 50 ccm Harn werden in einem Becherglase aus Jenaer Glas von 200—300 ccm Inhalt mit 10 bis 20 ccm 10%iger alkalifreier Baryumpermanganatlösung und 10 ccm 10%iger Schwefelsäure unter fleißigem Umrühren zum Sieden erhitzt. Hierdurch werden die organischen Substanzen des Harns rasch und leicht zerstört. Sollte die Rotfärbung rasch verschwunden sein, so werden noch einige ccm Baryumpermanganatlösung zugegeben, und zwar so lange, bis die rote Farbe nach 10 bis 15 Minuten langem, anhaltendem Sieden nur sehr langsam verschwindet. Ein Ueberschuß an Baryumpermanganat wird dann durch Oxalsäurelösung und nochmaliges Aufkochen leicht entfernt. Man versetzt nun die noch heiße Flüssigkeit, ohne vorher zu filtrieren, mit Baryumchloridlösung im geringen Ueberschusse, dann mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion und fällt das überschüssig zugesetzte Chlorbaryum mit Ammoniumkarbonat in der Siedehitze aus. Da sich die in der kochend heißen Lösung hergestellten Niederschläge gut absetzen, können die für die Fällungen nötigen Mengen Chlorbaryum und Ammoniumkarbonat leicht erkannt werden. Nach dem Absetzen gießt man die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit durch ein Filter, oder saugt sie besser auf einer Nutsche ab, spült den Niederschlag so lange mit heißem Wasser aus, bis dieses chlorfrei abläuft, dampft das Filtrat in gewogener Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockene ein, glüht den Trockenzustand gelinde über der einfachen Bunsenflamme und wägt ihn. Der erhaltene Glührückstand besteht aus Chlorkalium und Chlornatrium, dem manchmal eine Spur Magnesiumchlorid[2]) beigemengt ist. Zur Bestimmung des Kaliums löst man diesen Rückstand in wenig Wasser, fügt Platinchloridchlorwasserstoffsäure (»Platinreagens«) hinzu, bis kein Niederschlag mehr entsteht und die über dem Kaliumplatinchloridniederschlage stehende Flüssigkeit intensiv gelb gefärbt erscheint, so daß voraussichtlich alles vorhandene Natriumchlorid in Natriumplatinchlorid übergeführt ist, ferner die 4- bis 5 fache Menge absoluten Alkohol, rührt um, läßt 10—12 Stunden bedeckt absitzen und sammelt alsdann den Niederschlag auf einem bei 120° getrockneten Filter oder in einem bei derselben Temperatur getrockneten Goochtiegel. Schließlich wird der Niederschlag so lange mit Alkohol ausgewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft, dann bei 120° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die dem Gewichte des erhaltenen Kaliumplatinchlorids entsprechende Menge Chlorkalium erfährt man unter Anwendung der Proportion

---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 38, 401 (1899).

[2]) Nach diesem Verfahren wird das Magnesium des Harns bis auf unwesentliche Spuren, welche in Lösung bleiben, als Magnesiumammoniumphosphat ausgefällt.

$$K_2PtCl_6 : 2KCl = \text{gewogene Menge } K_2PtCl_6 : x$$

Da der Quotient $\frac{2\ KCl}{K_2\ PtCl_6} = \frac{149,2}{485,2} = 0,30712$ ist, so muß das Gewicht des erhaltenen Kaliumplatinchlorids mit 0,30712 multipliziert werden, um die Menge Chlorkalium von den abgemessenen 50 ccm Harn zu erfahren. Subtrahiert man das Gewicht des Chlorkaliums von dem vorher ermittelten Gewichte der Summe der beiden Chloralkalimetalle, so erfährt man die Menge Chlornatrium, welche in 50 ccm des untersuchten Harns enthalten ist.

2) Nach Lehmann[1]). Um zu verhindern, daß durch das Veraschen des Harns auf trockenem Wege Verluste an Alkalichloriden eintreten, die sich ja schon bei schwacher Glühhitze zum Teil verflüchtigen, führt Lehmann durch zugesetztes Ammoniumsulfat die Chloride in Sulfate über, die im Unterschiede zu den Alkalichloriden feuerbeständig sind.

Ausführung. Man verdampft 100 ccm Harn oder, falls ein konzentrierter Harn mit einem spez. Gew. von über 1,020 vorliegt, bloß 50 ccm unter Zusatz von 4—5 g Ammoniumsulfat in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockene und verascht den Rückstand durch vorsichtiges Glühen über freier Flamme, zuerst auf einem Asbestdrahtnetze, dann auf einem Tondreieck. Brennt sich die Asche nicht ganz weiß, so befeuchtet man sie mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, raucht die überschüssige Schwefelsäure ab und glüht wieder. Die Asche wird in heißer verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung filtriert und das Filter chlorfrei gewaschen. Das so erhaltene und zum Sieden erhitzte Filtrat wird mit heißer Chlorbaryumlösung im geringen Ueberschusse ausgefällt, noch heiß, mit Ammoniak übersättigt, dann mit Ammoniumkarbonat das in Lösung befindliche Baryum gefällt. Das Chlorbaryum fällt hierbei die Schwefelsäure aus, das Ammoniak in Verbindung mit Ammoniumkarbonat die Phosphorsäure, den Kalk, die Magnesia sowie das überschüssige Baryum, während die Alkalimetalle als Chloride in Lösung bleiben[2]). Da aber auch der entstandene voluminöse Niederschlag hartnäckig Alkalichlorid durch Adsorption zurückhält, verdampft man die Flüssigkeit mit dem Niederschlage in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockene, trocknet den Rückstand noch bei 110—120 ^{0} im Luftbade vollständig aus, übergießt ihn dann mit siedendem Wasser, das einige Tropfen Ammoniak enthält, filtriert ab und wäscht so lange aus, bis das Filtrat chlorfrei ist. Das aufgesammelte Filtrat darf mit Ammoniak und kohlensaurem Ammonium keinen Niederschlag mehr geben, andernfalls fällt man mit diesen Reagentien vollständig aus und hat diese Operation eventuell so oft zu wiederholen, bis das Filtrat mit derselben klar bleibt. Dieses Filtrat wird in einer geräumigen gewogenen Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockene

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 8, 508. (1883—84).

[2]) $\begin{matrix} K_2\ SO_4 \\ +\ Cl_2\ Ba \end{matrix} = 2KCl + BaSO_4.$

verdampft, der Rückstand vorsichtig aber nicht zu stark und zwar so lange geglüht, bis keine Salmiakdämpfe mehr auftreten. Der Rückstand, der in der Platinschale gewogen wird, besteht aus Chlorkalium und Chlornatrium, gemengt mit einer Spur Chlormagnesium, die aber vernachlässigt werden kann. In diesem gewogenen Rückstande wird das Kalium nach den unter 1) gemachten Angaben als Kaliumplatinchlorid gefällt und gewogen.

Die Bestimmung des Kaliums allein nach W. Autenrieth und R. Bernheim[1]).

Mit Hilfe des Natriumkobaltihexanitrits $Co(NO_2)_6Na_3$ läßt sich Kalium, wie zuerst de Koninck[2]) gefunden hat, neben Calcium, Magnesium und Natrium direkt nachweisen. Vorhandene Natriumsalze üben keinen nachweisbaren störenden Einfluß auf die Empfindlichkeit der Probe aus, die noch den Nachweis von 1 Aequivalent Kalium neben 4000 Aequivalenten Natrium gestattet. Der neben Natriumsalzen mit dem Kobaltreagens erhältliche Niederschlag, also auch der im Harn gefällte, hat keine konstante Zusammensetzung, indem er stets natriumhaltig erhalten wird. Infolgedessen kann das Kalium nicht in dieser Verbindungsform, »Kobaltgelb« genannt, zur Wägung gebracht werden; man kann aber das Kobaltgelb als Zwischenstufe für die Bestimmung des Kaliums in Salzgemischen neben Natrium und den anderen Metallen sehr gut gebrauchen. Schließlich wird das Kalium des Kobaltgelbniederschlags als Kaliumplatinchlorid oder als Kaliumperchlorat $KClO_4$ zur Wägung gebracht.

Bereitung des Kobaltreagenses. Man vermischt eine Lösung von 30 g krystallisiertem Kobaltnitrat, $Co(NO_3)_2 + 6H_2O$, in 60 ccm Wasser mit einer konzentrierten Lösung von Natriumnitrit, entsprechend 50 g $NaNO_2$, sowie mit 10 ccm Eisessig. Nach einigen Sekunden beginnt eine lebhafte Entwicklung von Stickoxydgas; hierbei geht das Kobalt in die dreiwertige Form über, was schon an der Farbenänderung der Lösung zu erkennen ist. Da das käufliche Natriumnitrit meist kaliumhaltig ist, so scheidet sich aus dem Reagens beim Stehenlassen in der Kälte etwas Kobaltgelb ab, das nach 2 oder 3 Tagen abfiltriert wird. — K. Gilbert verwendet ein verdünnteres Kobaltreagens, das in der folgenden Weise hergestellt wird. Man löst 10 g krystallisiertes essigsaures Kobaltoxydul sowie 90 g kaliumfreies Natriumnitrit zusammen in Wasser, fügt 25 ccm Essigsäure von 1,04 sp. Gew. hinzu und verdünnt mit Wasser zu 1 Liter.

Ausführung. Man versetzt 50 ccm des filtrierten Harns mit 6 bis 10 ccm des nicht verdünnten Kobaltreagenses, schüttelt um und läßt 6—8 Stunden, am besten bis zum anderen Tage, kalt stehen; dann bringt man den entstandenen Kobaltgelbniederschlag auf ein kleineres aschefreies Filter, spült ihn mit 40 bis 60 ccm kaltem Wasser, das mit einigen ccm Kobaltreagens versetzt ist, aus und trocknet ihn im Luftbade bei 110—120°. Den trockenen Niederschlag löst man möglichst

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 29 (1902).

[2]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 20, 390 (1881).

vollständig vom Filter los, was durch Aneinanderreiben der Filterflächen oder mit Hilfe einer Federfahne meist leicht erreicht wird, bringt ihn in eine kleinere flache Porzellanschale, verascht das Filter in einem Platin- oder Porzellantiegel, zieht die Asche wiederholt mit wenig heißem Wasser aus und bringt den filtrierten Auszug zum Niederschlag in der Porzellanschale. Nun läßt man zu diesem etwa 10 ccm 25%ige Salzsäure tropfenweise zufließen und erhitzt das Schälchen auf dem Wasserbade gelinde. Der Niederschlag geht hierbei mit tiefblauer Farbe in Lösung. Um einen Verlust durch Verspritzen bei der Zersetzung des Kobaltgelbes durch die Säure zu vermeiden, bedeckt man das Porzellanschälchen am besten mit einem Uhrglase. Die erhaltene blaue salzsaure Lösung des Kobaltgelbniederschlags dampft man auf dem Wasserbade zur staubigen Trockene ein, übergießt den Rückstand erst mit wenig Wasser, dann mit 10 ccm einer etwa 18%igen Ueberchlorsäure[1]) ($HClO_4$), rührt gut durch, verdampft wiederum auf dem Wasserbade und erhitzt darauf noch so lange, bis reichlich weiße Nebel von Ueberchlorsäure auftreten und der Rückstand staubtrocken geworden ist. Es empfiehlt sich, diesen Rückstand noch ein zweites Mal mit Ueberchlorsäure (5—10 ccm) einzudampfen. Das zurückbleibende trockene Gemenge der Perchlorate von Kalium, Natrium und Kobalt wird mit etwa 10 ccm eines 96%igen Alkohols, der 0,2% Ueberchlorsäure enthält, gut durchrührt, wodurch die Perchlorate von Natrium und Kobalt in Lösung gehen, während das Kaliumperchlorat ungelöst bleibt. Dieses wird in einem gewogenen Goochtiegel, dessen Asbestpolster nicht allzu dünn ist, gesammelt, erst mit einigen ccm überchlorsäurehaltigem Alkohol, dann mit einer Mischung aus gleichen Teilen Alkohol und Aether so lange ausgewaschen, bis eine Probe des Filtrats beim Eindunsten im Uhrschälchen kaum einen Rückstand mehr zurückläßt, und schließlich im Luftbad bei 120—130° bis zum konstanten Gewicht ausgetrocknet.

Multipliziert man das Gewicht des erhaltenen Kaliumperchlorates ($KClO_4$) mit 0,28247, da $\frac{K}{KClO_4} = \frac{39,15}{138,6} = 0,28247$ ist, so erfährt man die entsprechende Menge an Kalium.

Will man das Kalium nicht als überchlorsaures Salz ($KClO_4$), sondern als Kaliumplatinchlorid (K_2PtCl_6) zur Wägung bringen, so verascht man das vom Kobaltgelbniederschlag möglichst befreite Filter in einem Platin- oder Porzellantiegel, fügt dann den Niederschlag hinzu, und glüht einige Zeit ganz gelinde; das Kobaltgelb wird hierbei zersetzt und beim Auslaugen des Glührückstandes mit heißem Wasser bleibt Kobaltoxyd ungelöst, das man durch ein aschefreies Doppelfilterchen abfiltriert. Sollte das Kobaltoxyd beim Auswaschen, wie es zuweilen vorkommt, durchs Filter hindurchgehen, so fügt man zum Waschwasser wenig Chlornatrium. Das so erhaltene klare Filtrat, welches jetzt Kalium-

---

[1]) Eine reine kalium- und schwefelsäurefreie Ueberchlorsäure von 1,12 sp. Gew. kann von E. Merck-Darmstadt bezogen werden.

und Natriumnitrit, eventuell neben Chlornatrium enthält, verdampft man mit einigen ccm konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade zur Trockne, nimmt den Rückstand in wenig heißem Wasser auf, fügt 10 ccm Platinchloridchlorwasserstoffsäure hinzu, dampft auf dem Wasserbade zum Sirup ein und durchrührt diesen mit 30 ccm 90%igen Alkohol. Schließlich wird das ausgeschiedene Kaliumplatinchlorid im gewogenen Goochtiegel gesammelt, mit Alkohol so lange ausgewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft und bei 120—130° bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Bemerkungen. Verdünntere Harne, wie die meisten diabetischen Harne, werden vor dem Zusatze des Kobaltreagenses auf ein kleineres, auf 1/2, bis 1/3 des ursprünglichen Volumens, eingedampft. Um bei derartig verdünnten und voraussichtlich kaliarmen Harnen eine nicht zu kleine Menge Kaliumperchlorat oder Kaliumplatinchlorid zur Wägung zu bringen, empfiehlt es sich, 100 oder 200 ccm Harn in Arbeit zu nehmen. — Der normale menschliche Harn enthält nur solch geringe Mengen Ammoniumsalze, daß diese durch das Kobaltreagens nicht gefällt werden. Aber selbst, wenn sich mehr als Spuren von Ammoniumkobaltihexanitrit $[Co(NO_2)_6](NH_4)_3$, das in Wasser schwer löslich ist, dem Kobaltgelbniederschlage beimengen sollten, so beeinflussen diese das Endresultat durchaus nicht, wenn das Kalium nach der Ueberchlorsäuremethode bestimmt wird, weil das Ammoniumperchlorat $(NH_4)ClO_4$ in Alkohol reichlich löslich ist. 0,1 g Ammoniumperchlorat wird von 5 ccm des überchlorsäurehaltigen Alkohols (s. oben), innerhalb weniger Minuten gelöst.

Calcium und Magnesium.

Calcium und Magnesium sind wesentliche Bestandteile aller tierischen Organe und Körperflüssigkeiten; beide Metalle finden sich reichlich im Harn und in den Faeces, in Knochen, Zähnen und allen tierischen Gerüstsubstanzen. Phosphorsaures Calcium, und zwar sowohl das tertiäre $Ca_3(PO_4)_2$ wie das sekundäre Salz $CaHPO_4$, sowie die phosphorsaure Ammoniak-Magnesia $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$ kommen häufig in Harnsedimenten und Harnkonkrementen vor.

Nach neueren Untersuchungen von O. Gross[1]) enthält der menschliche Harn normalerweise erheblich mehr Calcium als Magnesium, und zwar finden sich in der 24stündigen Harnmenge des erwachsenen Menschen durchschnittlich 0,30—0,37 g CaO und 0,14—0,18 g MgO.

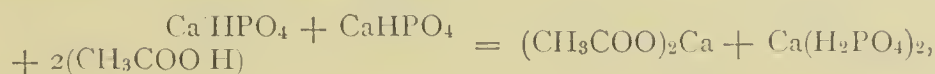
Nur ein verhältnismäßig kleiner Teil des resorbierten oder des direkt in das Blut gebrachten Kalks wird durch den Harn ausgeschieden, ein großer Teil geht durch den Darm ab. Die Mengen von Kalk und Magnesia, welche in den Harn übergehen, sind in erster Linie von der Art der Ernährung abhängig. Bei Ernährung mit Fleisch enthält die 24stündige Harnmenge nach Bunge 0,33 g Kalk und 0,29 g Magnesia und bei ausschließlicher Ernährung mit Weizenbrot 0,24 g Kalk und 0,14 Magnesia. — Reichliches Wassertrinken soll die Kalkausscheidung erhöhen. — Eine vermehrte Kalkausscheidung hat man bei verschiedenen Krankheiten beobachtet, besonders häufig beim Diabetes. Sie hängt hierbei

[1]) Inaug.-Dissertation Freiburg 1903.

vielleicht mit einer stärkeren Säurebildung, Bildung von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure, zusammen.

1. Bestimmung von Calcium und Magnesium im eiweissfreien Harn.

Durch Essigsäure wird das sekundäre und eventuell auch das tertiäre Calciumphosphat des Harns in das primäre oder zweifach saure phosphorsaure Calcium übergeführt.



$$\begin{matrix} CaHPO_4 + CaHPO_4 \\ + 2(CH_3COOH) \end{matrix} = (CH_3COO)_2Ca + Ca(H_2PO_4)_2,$$

aus welchem Ammoniumoxalat phosphorsäurefreies Calciumoxalat fällt[1]); in gleicher Weise wird auch das Calcium des essigsauren Calciums gefällt. Calciumoxalat ist sowohl in dem gebildeten zweifach sauren Phosphat als auch in der Essigsäure nicht absolut unlöslich, so daß bei dieser Bestimmung eine, wenn auch unwesentliche Menge Calcium zu wenig gefunden wird.

Ausführung. Man versetzt in einem Becherglas 200 ccm des filtrierten Harns mit Ammoniak bis zur Bildung eines Niederschlags, löst diesen wieder in möglichst wenig Salzsäure, fügt erst 10—20 ccm Natriumacetatlösung und dann Ammoniumoxalatlösung im Ueberschusse hinzu. Nun stellt man das Becherglas für ca. 2 Stunden auf ein warmes Wasserbad und für weitere 10 Stunden an einen warmen Ort; dann gießt man die über dem Calciumoxalatniederschlage stehende Flüssigkeit durch ein aschenfreies Filter, rührt den im Becherglase zurückgebliebenen Niederschlag mit heißem Wasser an, das mit einigen ccm Ammoniumoxalatlösung versetzt ist, läßt absitzen, gießt die geklärte Flüssigkeit wiederum durchs Filter und wiederholt dieses Dekantieren so oft, bis das Filtrat chlorfrei abläuft. Den ausgetrockneten Niederschlag löst man vom Filter, verascht das letztere an einem Platindraht und glüht dann Niederschlag samt Filterasche in einem gewogenen Platintiegel zuerst gelinde über der einfachen Bunsenflamme, alsdann 10 bis 15 Minuten stark über dem Gebläse. Der Glührückstand besteht aus Calciumoxyd CaO. 1 Tl. CaO = 0.7143 Tle. Calcium.

Bemerkungen. Calciumoxalat zerfällt beim Erhitzen in Kohlenoxyd und Calciumkarbonat (α) und das letztere bei starkem Glühen über einem Gebläse in Kohlendioxyd und Calciumoxyd (β):



$$\alpha.\ \begin{matrix} CO\,O \\ \vdots \\ CO\,O \end{matrix}\!\!>Ca = CO + CO_3Ca. \quad — \quad \beta.\ C=O\ \begin{matrix} O \\ \vdots \\ O \end{matrix}\!\!>Ca = CO_2 + CaO.$$

Um zu verhindern, daß sich in dem Harn Pilze ansiedeln, welche die klare Filtration des Calciumoxalatniederschlags mehr oder weniger erschweren, versetzt man den Harn mit Phenoloder Thymollösung.

Bestimmung des Calciums als Calciumsulfat. Verfügt man nicht über eine Gebläseflamme, so kann man das Calcium als

---

[1]) Fällt man den mit Ammoniak alkalisch gemachten Harn mit Ammoniumoxalat aus, so erhält man ein Gemenge von Calciumoxalat, Calciumphosphat und Magnesiumammoniumphosphat.

Sulfat zur Wägung bringen. Man befeuchtet dann den im gewogenen Platintiegel befindlichen, ausgetrockneten Calciumoxatalniederschlag samt Filterasche mit 6—10 Tropfen einer mäßig verdünnten Schwefelsäure (1 Tl. Säure und 2 Tle. Wasser), erwärmt zunächst gelinde, raucht dann die überschüssige Schwefelsäure ab, glüht den Rückstand über der einfachen Bunsenflamme und wägt ihn. Rückstand: $CaSO_4$.

Quotient $\frac{Ca}{CaSO_4} = \frac{40,09}{136,16} = 0,2944$. Man muß somit das Gewicht des erhaltenen Calciumsulfats mit 0.2944 multiplizieren, um die entsprechende Menge an Calcium zu erfahren.

Bestimmung des Magnesiums. Die vom Calciumoxalatniederschlage abfiltrierte Flüssigkeit (s. oben) wird samt Waschwasser auf ein möglichst kleines Volumen (30—50 ccm) eingedampft, dann werden einige ccm Ammoniumchloridlösung und $^1/_3$ Volumen Ammoniak von 0,96 % spez. Gewicht (= 10 % NH_3) zugesetzt. Das Magnesium wird hierbei als Magnesiumammoniumphosphat, $Mg(NH_4)PO_4 6H_2O$, gefällt. Ein Zusatz von Natriumphosphat ist nicht nötig, da ja der Harn eine genügende Menge Phosphorsäure enthält. Zur vollständigen Abscheidung des Magnesiums läßt man die Flüssigkeit 12, besser 24 Stunden kalt stehen, filtriert dann den Niederschlag durch ein aschenfreies Filter ab, wäscht so lange mit ammoniakhaltigem Wasser (1 Vol. Ammonniakflüssigkeit und 2 Vol. Wasser) aus, bis Silbernitrat in einer, mit Salpetersäure angesäuerten Probe des Filtrats nur noch eine schwache Opaleszenz hervorruft, und trocknet. Das vom Niederschlage möglichst befreite Filter verbrennt man in einer Platinspirale, glüht Niederschlag samt Filterasche in einem gewogenen Platin- oder Porzellantiegel zunächst gelinde, dann etwa 10 Minuten stark über einer größeren Bunsenflamme und wiegt den erkalteten Tiegel zurück. Ist der Glührückstand nicht rein weiß, wie dies meist bei dem aus Harn gewonnenen Niederschlage der Fall ist, so befeuchtet man ihn nach dem Erkalten mit 2—3 Tröpfchen konz. Salpetersäure, raucht die Säure vorsichtig ab und glüht den Rückstand nochmals stark. Dieser besteht aus Magnesiumpyrophosphat $Mg_2P_2O_7$. — Quotient $\frac{2Mg}{Mg_2P_2O_7} = \frac{48,64}{222,64} = 0,2185$. Man multipliziere also das Gewicht des erhaltenen Magnesiumpyrophosphats mit 0,2185, um die entsprechende Menge an Magnesium zu erfahren.

2. Bestimmung des Calciums und Magnesiums in einem eiweisshaltigen Harne.

Man verascht 200 ccm Harn nach dem A. Neumannschen Veraschungsverfahren, das unter dem Artikel Eisen ausführlich beschrieben ist, versetzt die erhaltene Aschenlösung mit Ammoniak bis zur alkalichen Reaktion, säuert mit Essigsäure an, filtriert einen sich hierbei bildenden Niederschlag ($FePO_4$) ab und fällt das Calcium mit überschüssigem Ammoniumoxalat aus[1]). Nun stellt man das Becherglas

[1]) Calciumoxalat ist in reinem Wasser in merklicher Menge löslich.

mit der Flüssigkeit 2 Stunden auf das siedende Wasserbad, läßt es noch 10—12 Stunden an einem warmen Orte stehen und filtriert den Calciumoxalatniederschlag ab. Dieser wird unter Dekantation so lange ausgewaschen, bis eine Probe des Filtrats, mit Schwefelsäure angesäuert und erwärmt, einen Tropfen der für die Titration dienenden annähernd $^{1}/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung nicht mehr entfärbt. Hierdurch wird bewiesen, daß überschüssig zugesetztes Ammoniumoxalat sowie etwa vorhanden gewesene salpetrige Säure vollständig entfernt sind. Nun spült man den Niederschlag vom Filter in das Becherglas oder Kolben, in dem man die Fällung ausgeführt hat, zurück, gießt reichlich verdünnte Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf 70—80° und läßt zu der heißen Flüssigkeit die annähernd $^{1}/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung bis gerade zur schwachen Rotfärbung hinzufließen. Die Permanganatlösung ist auf eine $^{1}/_{10}$ n-Oxalsäurelösung oder besser auf eine genau abgewogene Menge reiner kristallisierter Oxalsäure einzustellen.

Berechnung. 1000 ccm $^{1}/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung entsprechen 1000 ccm $^{1}/_{10}$ n-Oxalsäurelösung und diese wieder $\frac{Ca}{2 \times 10} = \frac{40}{20}$ $= 2$ g Calcium. Somit zeigen 1000 ccm $^{1}/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung ebenfalls 2 g Calcium an.

Bemerkung. Man kann selbstverständlich das ausgefällte und ausgewaschene Calciumoxalat nach den obigen Angaben auch gewichtsanalytisch bestimmen, indem es in einem gewogenen Platintiegel zunächst gelinde, dann stark über einem Gebläse geglüht und das zurückbleibende Calciumoxyd (CaO) gewogen wird.

Magnesium. In der vom Calciumoxalatniederschlage abfiltrierten Flüssigkeit wird das Magnesium nach Seite 43 bestimmt.

Titrierung der phosphorsauren Ammoniak-Magnesia nach Neubauer.

Statt den erhaltenen Magnesiumammoniumphosphatniederschlag durch Glühen in Magnesiumpyrophosphat überzuführen und dieses zu wägen, kann die Phosphorsäure der essigsauren Lösung des Niederschlags mit Hilfe von Uranylacetatlösung und Verwendung von Cochenilletinktur als Indikator maßanalytisch bestimmt werden.

Man spült den auf dem Filter befindlichen, mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschenen Niederschlag ($PO_4Mg(NH_4) + 6H_2O$) mit Hilfe einer Spritzflache in ein Becherglas, löst ihn in Essigsäure auf und bestimmt die in der Lösung befindliche Phosphorsäure nach dem Verfahren von Seite 32 mit titrierter Uranylacetatlösung.

Nach der Proportion



$$P_2O_5 : 2\ Mg = \text{gefundene Menge } P_2O_5 : x$$

erfährt man dann die der gefundenen Phosphorsäure (P_2O_5) entsprechende

Nach Richards lösen 100 ccm Wasser von 95° 0,00145 g Calciumoxalat
» » » » 25° 0,00068 g »
In ammoniumoxalathaltigem Wasser ist Calciumoxalat praktisch genommen unlöslich.

Menge Magnesium. Quotient $\frac{2\,Mg}{P_2O_5} = \frac{48{,}68}{142} = 0{,}3428$. — Man multipliziere somit die gefundene Menge P_2O_5 mit 0,3428, um die entsprechende Menge an Magnesium in Erfahrung zu bringen.

Ammoniak.

Der Abschnitt »Ammoniak« ist aus Zweckmäßigkeitsgründen unter den stickstoffhaltigen organischen Bestandteilen des Harns aufgenommen worden.

Eisen.

Unter normalen Verhältnissen wird vom gesunden Menschen mit der 24-stündigen Harnmenge etwa 1 mg Eisen ausgeschieden; es kommen aber beträchtliche Schwankungen im Eisengehalt des Harns vor. Die Uebereinstimmung in den Ergebnissen der einzelnen Eisenbestimmungen verschiedener Harne ist eine so große, daß an einem regelmäßigen Vorkommen des Eisens im Harne des Menschen kaum mehr gezweifelt werden kann. Bei gewissen Krankheiten, wie bei hohem Fieber, bei Lebererkrankungen, Leukämie, Nephritis hat man die Eisenausscheidung in der Regel etwas vermehrt gefunden. Besonders hoch ist die bei Diabetes im Harne gefundene Eisenmenge, die, auf die 24-stündige Harnmenge bezogen, 2 bis 22 mg Eisen betragen kann. Bei Zufuhr von Eisen in Form eisenhaltiger Arzneimittel spielt die Niere als Ausscheidungsorgan allem Anscheine nach nur eine untergeordnete Rolle. Ob überhaupt bei innerlicher Darreichung von Eisenpräparaten erheblichere Mengen Eisen mit dem Harne ausgeschieden werden, scheint zweifelhaft zu sein; nach dem bis jetzt vorliegenden Untersuchungsmaterial erfolgt nach Einnahme von Ferrum citricum keine, und nach solcher von rein organischen Eisenverbindungen wie Eidotter, Hämoglobin, Hämatin und Hämogallol tritt nur eine außerordentlich kleine Vermehrung des Harneisens ein. — Das Eisen kommt im Menschenharn nur in organischer Bindung vor, da es sich nicht im Harn direkt, sondern nur in der Harnasche nachweisen läßt.

Die Veraschung des Harns auf nassem Wege, oder Säuregemisch-Veraschung, nach A. Neumann[1]) und die Bestimmung des Eisens im Harn.

Ein Vorzug dieses neueren Verfahrens von A. Neumann vor den älteren Verfahren besteht darin, daß während der ganzen Substanzzerstörung eine Verkohlung nicht eintritt, weil durch ein stark wirkendes und beständig zufließendes Oxydationsmittel, nämlich das Säuregemisch, der Kohlenstoff der organischen Harnsubstanzen vollständig zu Kohlendioxyd oxydiert wird. Da andererseits verkohlte, also freien Kohlenstoff haltige Massen bedeutend schwerer verbrennlich sind als die

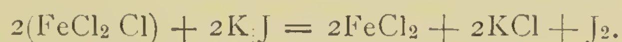
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 115—148 (1902/03).

ursprüngliche organische Substanz, so erfolgt bei dieser Methode die Zerstörung erheblich schneller als bei der trockenen Veraschung in der Platinschale oder bei der Substanzzerstörung nach Kjeldahl.

Apparate. Die Säuregemisch-Veraschung wird in einem schief liegenden Rundkolben aus Jenaer Glas ausgeführt, und zwar in einem Rundkolben von normaler Halslänge 10 cm und einem Inhalt von $^1/_2$—$^3/_4$ Liter. Ueber dem Kolben befindet sich in einem Glas- oder Porzellanringe ein Hahntrichter, welcher zweckmäßig mit einer Tropfkapillare versehen ist. Das Ganze ist an einem Stativ befestigt.

Säuregemisch. Man gießt langsam und unter Umschütteln $^1/_2$ Liter konzentrierte Schwefelsäure in $^1/_2$ l konzentrierte Salpetersäure vom spez. Gew. 1,4.

Jodometrische Eisenbestimmung im Harn. Hat man im Harn mit Hilfe der Säuregemisch-Veraschung die störenden organischen Stoffe beseitigt, so läßt sich das in der Lösung befindliche Eisen jodometrisch bestimmen, da es in der dreiwertigen Form vorliegt. Da im Harn immer Phosphorsäure zugegen ist, so erhält man beim Uebersättigen der sauren Flüssigkeit mit Ammoniak das Eisen ganz oder teilweise als Ferriphosphat gefällt, welches aber im überschüssigen Ammoniak nicht ganz unlöslich ist. A. Neumann hat nun gefunden, daß das Eisen quantitativ mit in den Niederschlag übergeht, wenn man in der schwach ammoniakalischen Lösung einen Niederschlag von Zinkammoniumphosphat erzeugt. Die kristallinische Zinkfällung, welche alles Eisen enthält, läßt sich gut abfiltrieren und auswaschen. Hierbei fällt man aber nicht alle Phosphorsäure, sondern nur eine kleine Menge aus, die aber dann alles Eisen im Zinkammoniumphosphatniederschlage enthält. Das mit dem »Zinkreagens« (s. unten) ausgefällte Eisenoxyd wird nach dem Lösen in Salzsäure mit Jodkalium zusammengebracht und das hieraus nach der Gleichung



$$2(FeCl_2 Cl) + 2KJ = 2FeCl_2 + 2KCl + J_2.$$

frei gemachte Jod schließlich mit einer ca. $^1/_{250}$ n-Natriumthiosulfatlösung maßanalytisch bestimmt. Die letztere wird gegen eine unter Säurezusatz hergestellte, sehr verdünnte Eisenchloridlösung eingestellt.

Erfordernisse. 1. Eisenchloridlösung, welche 2 mg Eisen in 10 ccm Lösung enthält. Zur Herstellung dieser Lösung geht man von der »Fresenius-schen Eisenchloridlösung« aus. Die letztere wird in der Weise hergestellt, daß man 10,04 g blank geputzten, dünnen, weichen Eisendraht, sogenannten Blumendraht, in einem schief liegenden langhalsigen Kolben (man verwende einen Kjeldahlkolben) in konzentrierter Salzsäure löst, die Lösung mit chlorsaurem Kalium oxydiert, den Chlorüberschuß durch längeres gelindes Kochen vollständig entfernt und die Lösung schließlich mit Wasser auf 1 Liter verdünnt [1]).

Man bringt dann 20 ccm der fertigen Fresenius'schen Eisenchloridlösung in einen Litermeßkolben, fügt 2 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) hinzu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Diese Lösung ist längere Zeit haltbar, wenn sie in brauner Flasche aufbewahrt wird. 10 ccm dieser Eisenchloridlösung enthalten 2 mg Eisen.

2. Etwa $^1/_{250}$ n-Natriumthiosulfatlösung. Man löst 1 g Natrium-

[1]) Die fertige Fresenius'sche Eisenchloridlösung kann von C. A. F. Kahlbaum in Berlin bezogen werden.

thiosulfat ($Na_2S_2O_3 + 5H_2O$) und 1 g Ammoniumkarbonat zusammen in 1 Liter Wasser. Aufbewahrung ebenfalls in brauner Flasche.

3. Zinkreagens. 25 g krystallisiertes Zinksulfat ($ZnSO_4 + 7H_2O$) und 100 g Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 + 12H_2O$) werden jedes für sich in Wasser gelöst, die Lösungen in einem Litermeßkolben vereinigt, der entstandene Niederschlag von Zinkphosphat wird mit verdünnter Schwefelsäure gerade wieder gelöst und diese Lösung schließlich mit Wasser zum Liter aufgefüllt.

Alle zur Eisenbestimmung benutzten Reagenzien müssen selbstverständlich eisenfrei sein!

Titerstellung der Thiosulfatlösung. Da eine sehr verdünnte Thiosulfatlösung nicht unverändert haltbar ist, muß der Titer der Lösung vor jeder Eisenbestimmung erst festgestellt werden, was in der folgenden Weise geschieht: Man versetzt 10 ccm obiger Eisenchloridlösung (1) in einem Kölbchen mit etwas Wasser und mit etwa 1 g Jodkalium, erwärmt auf 50, höchstens 60°, kühlt ab, fügt einige ccm Stärkelösung hinzu und läßt die Thiosulfatlösung so lange aus einer Bürette zufließen, bis die blaue Farbe über Rotviolett gerade verschwindet. Die hierzu verbrauchten ccm Thiosulfatlösung entsprechen dann genau 2 mg Eisen.

Säuregemisch-Veraschung des Harns. Man vermischt 500 ccm Harn mit 50 ccm konzentrierter Salpetersäure, bringt dieses Gemisch in einen Tropftrichter (Hahntrichter) und läßt es tropfenweise in einen Rundkolben fließen, in welchem 30 ccm konzentrierte Salpetersäure zum Sieden erhitzt sind. Man reguliert das Zutropfen des Harn-Salpetersäuregemisches so, daß bei starkem Sieden der Flüssigkeit im Rundkolben, der am besten auf einem Baboblech erhitzt wird, keine allzu große Volumvermehrung, höchstens bis zu 100 ccm, eintritt. Kolben und Hahntrichter werden mit wenig verdünnter Salpetersäure nachgespült. Gegen Schluß der Verdampfung wird die Flamme, wenn nötig, verkleinert. Hat man die Flüssigkeit bis auf etwa 50 ccm eingedampft, so gibt man durch den Hahntrichter abgemessenes Säuregemisch (gleiche Vol. konz. $HNO_3 + H_2SO_4$, s. oben), nämlich 5—10 ccm, hinzu und erwärmt zunächst nur mäßig mit kleiner Flamme. Sobald die Entwicklung der braunen nitrosen Dämpfe geringer wird, läßt man aus dem Hahntrichter weiteres Säuregemisch zutropfen und fährt damit fort, bis ein Nachlassen der Reaktion eintritt und die Intensität der braunen Dämpfe abgeschwächt erscheint. Um zu entscheiden, ob die Substanzzerstörung beendet ist oder nicht, unterbricht man das Hinzufließenlassen des Säuregemisches für kurze Zeit, erhitzt aber weiter, bis die braunen Dämpfe verschwunden sind, und beobachtet, ob sich die Flüssigkeit im Kolben dunkler färbt oder gar noch schwärzt. Ist dieses der Fall, so läßt man wieder Säuregemisch zufließen und wiederholt nach einigen Minuten die gleiche Probe. Wenn nach dem Abstellen des Gemisches und dem Verjagen der braunen Dämpfe die hellgelbe oder farblose Flüssigkeit sich bei weiterem Erhitzen nicht mehr dunkler färbt und auch keine Gasentwicklung mehr zeigt, dann ist die

Veraschung beendigt. Nun erhitzt man noch 1/2 bis 3/4 Stunden weiter, wenn das Veraschungsprodukt schon ganz hell und klar geworden ist. Man fügt dann dreimal so viel Wasser hinzu, wie Säuregemisch verbraucht wurde, erhitzt und kocht noch etwa 10 Minuten. Hierbei entweichen nochmals braune Dämpfe, welche von der Zersetzung der entstandenen Nitrosylschwefelsäure herrühren.

Nach dem Abkühlen der erhaltenen »Aschenlösung« des Harns fügt man 10 ccm der genau abgemessenen Eisenchloridlösung (1), 20 ccm »Zinkreagens« (3) und alsdann so lange Ammoniak hinzu, bis der weiße Zinkniederschlag gerade bestehen bleibt. Bis zur annähernden Neutralisation nimmt man konzentriertes, später verdünntes Ammoniak. Nun gibt man ein wenig Ammoniak im geringen Ueberschusse hinzu, bis der weiße Niederschlag gerade wieder verschwindet, und erhitzt auf einem Baboblech zum Sieden. Wenn kristallinische Trübung eingetreten ist, erhitzt man noch etwa 10 Minuten lang recht vorsichtig. Der sich ausscheidende kristallinische Niederschlag setzt sich schnell ab und kann durch Dekantieren von der Flüssigkeit leicht getrennt werden. Man setzt nun den Rundkolben auf einen Statifring, gießt die heiße Flüssigkeit durch ein kleineres, aschefreies, anliegendes Filter von 3 bis 4 ccm Radius und prüft eine kleinere Probe des Filtrats mit Salzsäure und Rhodankalium auf Eisen. Es darf hierbei nur eine äußerst schwache Rotfärbung eintreten. War die Färbung deutlich rot, so muß man die schon abfiltrierte Flüssigkeit zurückgießen, das Ganze nochmals auf dem Baboblech erhitzen und wiederum prüfen. Ist alles Eisen ausgefällt, so wird der Niederschlag im Rundkolben etwa 3mal durch Dekantieren mit heißem Wasser ausgewaschen. 5 ccm des zuletzt aufgesammelten Waschwassers dürfen dann beim Versetzen mit wenig Jodkalium, mit Stärkelösung und einem Tropfen Salzsäure keine oder nur eine äußerst schwache Violettfärbung zeigen: Prüfung auf Jod frei machende Substanzen wie auf salpetrige Säure. Nun wird der Trichter mit dem Filter auf dem Rundkolben, in welchem sich noch die Hauptmenge des Zinkeisenniederschlags befindet, gesetzt, das Filter zweimal mit verdünnter heißer Salzsäure gefüllt und mit heißem Wasser 4 bis 5 mal ausgewaschen. Eine Probe des letzten Waschwassers darf ebensowenig wie das Filter mit Rhodankalium eine Rotfärbung geben. Jetzt befindet sich das gesamte Eisen in salzsaurer Lösung im Kolben. Da aber die Flüssigkeit für die Titration nur schwach sauer sein darf, wird zunächst mit verdünntem Ammoniak neutralisiert, bis gerade wieder der weiße Zinkniederschlag bestehen bleibt und alsdann durch portionenweises Zugeben von je 10 Tropfen verdünnter Salzsäure gerade wieder völlig klar gelöst. Diese Lösung wird sodann in derselben Weise titriert, wie es für die 10 ccm Eisenchloridlösung bei der Titerstellung der Thiosulfatlösung angegeben ist.

Berechnung an einem Beispiel. Ergab die Titerstellung, daß 10 ccm Eisenchloridlösung mit 2 mg Eisen 9,2 ccm der Thiosulfatlösung erforderten, und wurden bei der Haupttitration 12,5 ccm der-

selben Thiosulfatlösung verbraucht, so berechnet sich aus der Proportion

$$9,2 : 2 = 12,5 : x$$
$$x = 2,72 \text{ mg Eisen.}$$

500 ccm des für die Eisenbestimmung in Arbeit genommenen Harns haben somit 2,72 -2,0 = 0,72 mg Eisen enthalten.

Organische Bestandteile des Harns.

1. Stickstofffreie Substanzen.

A. Aliphatische stickstofffreie Substanzen.

Glycerinphosphorsäure. Organisch gebundene Phosphorsäure.

Glycerinphosphorsäure $C_3H_7O_3 . PO(OH)_2$ kann wohl als normaler Bestandteil des Menschenharns angesehen werden, der aber, wenn überhaupt, höchstens Spuren von Glycerinphosphorsäure enthält. Manche Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, sind der Ansicht, daß die Glycerinphosphorsäure nicht präformiert, sondern als Lecithin im Harn enthalten sei und aus letzterem bei der Verarbeitung des Harns als Kunstprodukt hervorgehe. So lange diese Frage nicht eindeutig entschieden ist, sollte man von der an organische Substanz gebundenen Phosphorsäure des Harns sprechen. Es scheint, daß ein Teil der organischen Phosphorsäure auch als Nukleinsäure im Harn vorkommen kann. Eingegebene Glycerinphosphorsäure geht weder beim Menschen noch beim Hund direkt in den Harn über. Ebensowenig läßt sich nach Verfütterung von Gehirn oder einer reichlicheren Menge von Nukleinsäure eine gepaarte Phosphorsäure im Harn des Hundes nachweisen. Zuelzer[1]) fand im normalen Harn von 24 Stunden auf 1,86 g Gesamtphosphorsäure 0,042 g organisch gebundenes in einem anderen Falle 1,6 g und 0,06 g P_2O_5. H. Oertel[2]) ist bei seinen umfassenden Untersuchungen zu dem gleichen Resultate gelangt, daß nämlich bei einer täglichen Ausscheidung von ungefähr 2,0 g Gesamtphosphorsäure im Mittel 0,05 g P_2O_5 als organisch gebundener Phosphor ausgeführt werden. Die höchste Tagesmenge war 0,120, die niedrigste 0,03 g; doch dürften dies Seltenheiten sein.

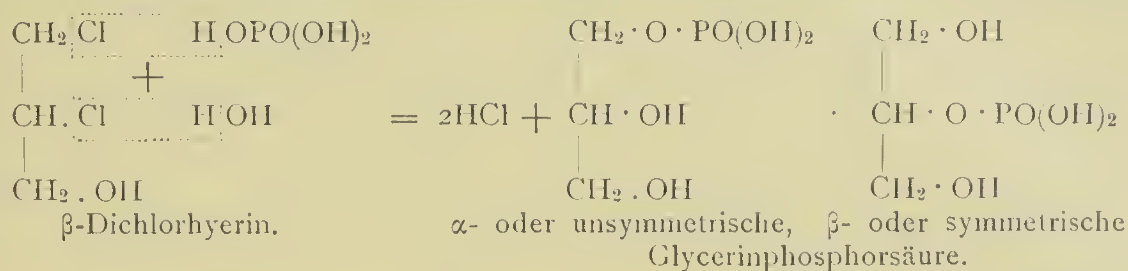
Glycerinphosphorsäure bildet einen unbeständigen Syrup, der beim Erwärmen seiner konzentrierten wässerigen Lösung in Glycerin und Phosphorsäure zerlegt wird. Sie ist eine zweibasische Säure, deren Salze in Wasser löslich, in Alkohol aber unlöslich oder schwer löslich sind. Es gibt mehrere Glycerinphosphorsäuren. Die α- oder unsymmetrische Glycerinphosphorsäure haben Fr. Tutin und A. Haun[3]) bei 8stün-

[1]) Neubauer-Vogel, Analyse des Harns 1910.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 121 (1898/99).

[3]) Proceedings Chem. Soc. 22, 273 (1906) sowie Journ. Chem. Soc. London 89, 1749 (1906).

digem Erhitzen von β-Dichlorhydrin und kristallisierter Phosphorsäure auf 150—180° erhalten und die β- oder symmetrische Glycerinphosphorsäure aus äquivalenten Mengen α-Dichlorhydrin und Phosphoroxychlorid.



β-Dichlorhyerin. α- oder unsymmetrische, β- oder symmetrische Glycerinphosphorsäure.

Auch bei 24stündigem Erhitzen molekularer Mengen von Glycerin und Phosphorsäure auf 105—110° erhielten Power und Tutin eine Glycerinphosphorsäure. Die natürliche, durch Hydrolyse des Lecithins erhältliche Glycerinphosphorsäure zeigt Linksdrehung und muß deshalb der unsymmetrischen Formel entsprechen. Man erhält diese Glycerinphosphorsäure in Form ihres Baryumsalzes durch Erhitzen von Lecithin mit Barytwasser, Filtrieren, Einleiten von Kohlensäure in das Filtrat, abermaliges Filtrieren und Ausfällen des hierbei erhaltenen Filtrats mit Alkohol.

Nachweis und quantitative Bestimmung des organisch gebundenen Phosphors im Harn nach H. Oertel.

50 ccm Harn werden in einer Silberschale[1]) zur Trockne verdampft; der Rückstand wird mit Salpeter und Aetzkali geschmolzen, die Schmelze nach dem Erkalten mit heißem Wasser aufgenommen, dann ohne Verlust in einem größeren Erlenmeyerkolben übergespült und in Salpetersäure unter Erwärmen gelöst. Die so erhaltene, eventuell filtrierte salpetersaure Lösung der Schmelze wird mit ziemlich viel Molybdatreagens versetzt, ca. 2 Stunden auf dem warmen Wasserbade gelinde erhitzt, der hierbei gebildete Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammonium abfiltriert und mit einer salpetersäurehaltigen Ammoniumnitratlösung (4% $(NH_4)NO_3$) ausgewaschen. Nun wird der Niederschlag auf dem Filter in möglichst wenig Ammoniakflüssigkeit gelöst — man gieße das Filtrat wiederholt auf das Filter zurück — und die Phosphorsäure des Filtrats in der üblichen Weise mit Magnesiamischung ausgefällt. Nach 24stündigem Stehen wird der Niederschlag von $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$ abfiltriert, mit wenig verdünntem Ammoniak chlorfrei gewaschen, getrocknet und durch Glühen im gewogenen Platin- oder Porzellantiegel im Magnesiumpyrophosphat $Mg_2P_2O_7$ übergeführt. Dieses wird gewogen und auf P_2O_5 oder PO_4 umgerechnet. Durch diese Bestimmung erfährt man die Gesamtmenge an Phosphor von 50 ccm Harn und zwar ausgedrückt als P_2O_5 oder PO_4.

Zur Bestimmung des organisch gebundenen Phosphors wird eine neue Quantität desselben Harns verwendet. Man fällt zu diesem

[1]) In Ermangelung einer Silberschale kann der Versuch auch in einem geräumigen blanken Nickeltiegel ausgeführt werden.

Zweck aus 50, besser 100 ccm, des Harns die Phosphate mit überschüssigem Ammoniak plus Chlorcalcium vollständig aus, filtriert ab, dampft das Filtrat ein und schmilzt den Rückstand in der angegebenen Weise in einer Silberschale oder einem Nickeltiegel mit Salpeter und Aetzkali zusammen. In der erkalteten und gelösten Schmelze wird dann die Phosphorsäure genau nach den obigen Angaben mit Molybdatreagens ausgefällt und als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt. Das Ergebnis dieser Bestimmung liefert uns die Phosphorsäure (als P_2O_5 oder richtiger als PO_4 berechnet) des organisch gebunden gewesenen Phosphors von der abgemessenen Harnmenge.

Die flüchtigen Fettsäuren.

Jeder normale Menschenharn dürfte wenigstens Spuren flüchtiger Fettsäuren, insbesondere Essigsäure, Ameisensäure und Buttersäure enthalten. Die Angaben über den Gehalt des normalen Harns an diesen, mit Wasserdämpfen flüchtigen Säuren schwanken außerordentlich, was zweifelsohne darauf zurückzuführen ist, daß die verschiedenen Untersucher nach verschiedenen Methoden gearbeitet haben, die kaum übereinstimmende Werte liefern können. So fand von Jaksch[1]) in der Tagesmenge normalen Harns nur 8—9 mg flüchtige Säuren, während andere Forscher erheblich mehr fanden. Magnus Levy[2]) fand bei gemischter Kost mit etwas reichlicher Aufnahme von Obst und Gemüsen in der 24stündigen Harnmenge 60 mg flüchtige Fettsäuren und zwar auf Essigsäure berechnet. Es ließ sich in den erhaltenen Destillaten reichlich Essigsäure neben wenig Ameisensäure und Buttersäure nachweisen. Bei Diabetes, Ikterus und gewissen Lebererkrankungen wurde die Menge an flüchtigen Fettsäuren zum Teil außerordentlich stark vermehrt befunden. Bemerkenswert ist die schon Liebig bekannt gewesene Tatsache, daß sich bei der ammoniakalischen Gährung des Harns größere Mengen flüchtiger Fettsäuren bilden und im Harn vorfinden. Diese Säuren gehen höchst wahrscheinlich aus den normalerweise im Harne vorkommenden Kohlehydraten hervor. Ein solcher, in ammoniakalische Gährung übergegangener Harn enthält 6 bis 15 Mal mehr flüchtiger Fettsäuren als ein frischer Harn (Salkowski).

Nachweis und quantitative Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren.

Da eine zum Harn zugesetzte Mineralsäure, wie Schwefelsäure oder Phosphorsäure, den im Harne vorhandenen Harnstoff bei der Destillation in kohlensaures Ammonium überführt und dadurch gebunden wird, so muß man dementsprechend so viel Säure zusetzen, daß womöglich alles, aus dem Harn hervorgehende kohlensaure Ammonium gebunden

---

[1]) Vgl. den betreffenden, ausführlich gehaltenen Abschnitt in Neubauer-Vogel, »Die Analyse des Harns«. 1910.

[2]) Salkowski-Festschrift 1904, 252.

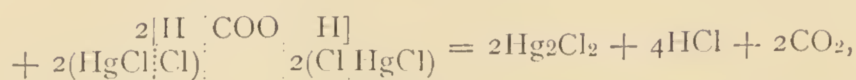
wird und sich Mineralsäure noch im Ueberschusse vorfindet. Nach den Angaben in der Literatur sind hierzu im allgemeinen für 100 ccm Harn 10 ccm Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,275 oder 8,5 g konzentrierte Schwefelsäure erforderlich. Bei derartigen Destillationen des Harns mit überschüssigen Mineralsäuren besteht die Gefahr, daß die aus den Chlormetallen frei gemachte Salzsäure teilweise in das Destillat übergeht. Man messe daher das aufgesammelte Destillat und prüfe eine aliquote Menge desselben mit Silbernitrat bei Gegenwart von verdünnter Salpetersäure auf einen Salzsäuregehalt. Ist Salzsäure im Destillate nicht vorhanden, so kann die Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren durch Titration mit $^1/_{10}$ n-Natron- oder Kalilauge und Phenolphtaleïn als Indikator direkt bestimmt werden. Enthält aber das erhaltene Harndestillat Salzsäure, so neutralisiert man es mit Natriumkarbonat oder fügt dieses bis zur alkalischen Reaktion hinzu, verdampft alsdann zur Trockne und zieht den Rückstand wiederholt mit heißem absolutem Alkohol aus. Das aus der Salzsäure gebildete Kochsalz sowie das überschüssig zugesetzte Natriumkarbonat bleiben hierbei ungelöst, während die Natriumsalze der in Betracht kommenden Fettsäuren und der Benzoësäure sowie eine Spur p-Kresol in Lösung gehen. Die abfiltrierte alkoholische Lösung wird zur Trockne eingedunstet, der Rückstand in möglichst wenig Wasser gelöst, sodaß eine konzentrierte Lösung erhalten wird, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und in Eis gestellt, wobei der größte Teil der vorhandenen Benzoësäure auskristallisiert; man filtriert diese ab, wäscht mit wenig Eiswasser aus, neutralisiert das Filtrat kalt mit Natriumkarbonat und schüttelt etwa vorhandenes p-Kresol mit Aether aus. Die abgetrennte wässerige Lösung enthält jetzt im wesentlichen nur die Natriumsalze der flüchtigen Fettsäuren aus dem Harne; sie wird durch Erwärmen auf dem Wasserbade zuerst von Aether befreit, dann mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure stark angesäuert und wiederum der Destillation unterworfen. Die saure Reaktion des hierbei aufgesammelten Destillates ist durch freie Fettsäuren und durch eine Spur Benzoësäure bedingt. Man ermittelt den Säuregehalt des Destillats durch Titration mit $^1/_{10}$ n-Natron- oder Kalilauge und Phenolphtaleïn als Indikator und berechnet ihn in der Regel als Essigsäure.

$$1000 \text{ ccm } ^1/_{10} \text{ n-Alkalilauge} = \frac{C_2H_4O_2}{10} = 6 \text{ g Essigsäure.}$$

Verfahren von Magnus-Levy (l. c.). Man verdampft eine größere Menge Harn, mindestens die Tagesmenge, auf dem Wasserbade zum dünnen Syrup, sättigt mit schwefelsaurem Ammonium, filtriert ab, säuert mit Schwefelsäure an und zieht sofort in einem geeigneten Aetherextraktionsapparate aus. Aus der Aetherlösung wird zunächst der Aether abdestilliert, der Rückstand der Destillation unterworfen und der Säuregehalt des Destillates in der üblichen Weise durch Titration ermittelt.

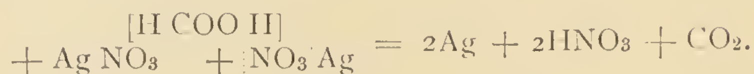
Beschränkt man sich auf den qualitativen Nachweis der in Betracht kommenden Säuren, so erhitzt man eine Probe des Destillates

mit Quecksilberchlorid auf etwa 30°; es scheidet sich Quecksilberchlorür als weißer Niederschlag aus, wenn Ameisensäure zugegen ist:



$$\begin{matrix} 2[H \vdots COO & H] \\ +\ 2(HgCl \vdots Cl) & 2(Cl\ HgCl) \end{matrix} = 2Hg_2Cl_2 + 4HCl + 2CO_2,$$

und aus einer verdünnten Silbernitratlösung wird unter den gleichen Bedingungen ein grauer oder schwarzer Niederschlag von metallischem Silber gefällt:



$$\begin{matrix} [H\ COO\ H] \\ +\ Ag\ NO_3 \quad +\ NO_3\ Ag \end{matrix} = 2Ag + 2HNO_3 + CO_2.$$

Ist Ameisensäure nachgewiesen, so oxydiert man dieselbe durch Erhitzen mit Quecksilberoxyd zu Kohlensäure und Wasser, fügt dann Natriumkarbonat im Ueberschusse hinzu, filtriert ab, dampft auf dem Wasserbade zur Kristallisation ein, wobei sich essigsaures Natrium in Kristallen ausscheidet; diese werden mit Hilfe von Eisenchloridlösung (Rotfärbung, beim Erhitzen Ausfällung von braunrotem basischem Ferriacetat) sowie durch Erhitzen mit wenig Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure durch die Bildung des charakteristisch riechenden Essigsäureäthylesters als solche erkannt. — K. R. Haberlandt[1]) hat ein Verfahren ausgearbeitet, nach welchem Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure fast quantitativ von einander getrennt werden können.

Man versetzt das durch Destillation mit Hilfe von Phosphorsäure aus dem Harne erhaltene Destillat mit Bleioxyd (PbO) und dampft auf dem Wasserbade ein. Der Rückstand wird in kaltem Wasser gelöst und die Lösung zum Kochen erhitzt. Basisch propionsaures Blei fällt hierbei aus; es wird abfiltriert und im Filtrate das überschüssige Blei mit Schwefelsäure entfernt. Die abfiltrierte Lösung dampft man mit Zinkoxyd zur Trockne ein und behandelt den Rückstand mit absolutem Alkohol. Ungelöst bleiben ameisensaures und schwefelsaures Zink, welche durch Destillation mit Phosphorsäure von einander getrennt werden. Die erhaltene absolut alkoholische Lösung des essigsauren und buttersauren Zinks wird zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Phosphorsäure überdestilliert und das Destillat mit kohlensaurem Silber neutralisiert. Hierbei wird ein Gemenge von essigsaurem und buttersaurem Silber enthalten, deren Trennung auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in Wasser gelingt. Man erhält zuerst eine Kristallisation von buttersaurem Silber, während aus der Mutterlauge essigsaures Salz erhalten wird.

1 Tl. buttersaures Silber löst sich in 260 Tln. Wasser von 15°.
1 Tl. essigsaures Silber löst sich in 100 Tln. Wasser von 15°.

Fett.

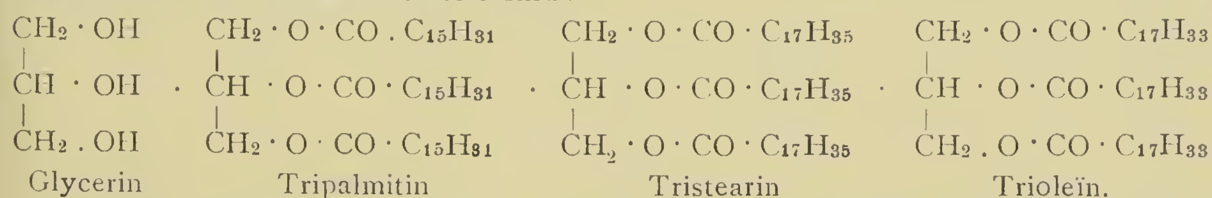
Der Harn des gesunden Menschen enthält Fett entweder nicht oder nur in minimalen Spuren, vielleicht nach Aufnahme abnorm großer

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 38, 217 (1899).

Fettmengen. Unter pathologischen Verhältnissen findet sich das Fett in sehr feiner Verteilung im Harn vor, und es bedingt dann ein *milchiges* Aussehen des Harns (*Chylurie*). Manchmal findet sich das Fett in größeren Tropfen vor, die sich beim Stehenlassen des Harns an der Oberfläche ansammeln. Unter dem Mikroskope sind auch die feineren Fetttropfen meist leicht als solche zu erkennen. Zum sicheren Nachweis des Fetts wird eine größere Menge Harn, 100—300 ccm, in einem Scheidetrichter, dessen Glasstöpsel nicht eingefettet ist, mit reinem, alkoholfreiem Aether ausgeschüttelt, die abgetrennte Aetherlösung durch ein trockenes Filter gegossen und abdestilliert oder eingedunstet. Das zurückbleibende Fett erkennt man daran, daß es auf einem Papier einen dauernd durchscheinenden Fleck (Fettfleck) hervorbringt und beim Erhitzen auf einem Platinblech mit Kaliumbisulfat den unangenehm stechenden Geruch des *Acroleïns* $CH_2 : CH \cdot CHO$ entwickelt.

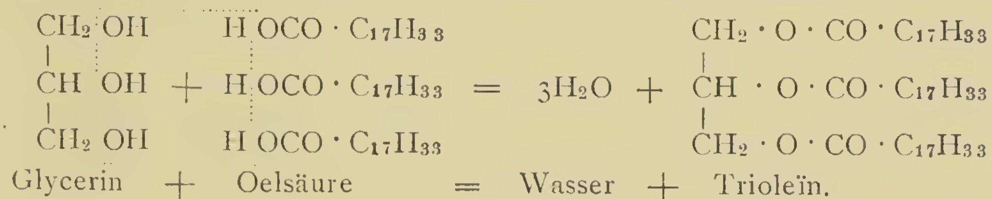
Ist die *milchige* Trübung des Harns durch Fett bedingt, so *klärt* sich der Harn beim Ausschütteln mit reinem Aether.

Bemerkungen. Die Mehrzahl der tierischen wie auch der pflanzlichen Fette besteht aus einem Gemenge von *Tripalmitin*, *Tristearin* und *Trioleïn*, die sich vom dreiwertigen Alkohol Glycerin in der Weise ableiten, daß dessen drei typischen Wasserstoffatome durch die Radikale der Palmitinsäure, Stearinsäure oder Oelsäure ersetzt sind:



Glycerin	Tripalmitin	Tristearin	Trioleïn
$CH_2 \cdot OH$	$CH_2 \cdot O \cdot CO . C_{15}H_{31}$	$CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{35}$	$CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33}$
$CH \cdot OH$	$CH \cdot O \cdot CO \cdot C_{15}H_{31}$	$CH \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{35}$	$CH \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33}$
$CH_2 . OH$	$CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{15}H_{31}$	$CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{35}$	$CH_2 . O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33}$

Die Fette können aus ihren Komponenten künstlich dargestellt werden; z. B. erhält man Trioleïn durch Erhitzen von Glycerin mit überschüssiger Oelsäure auf 240°:



$$\begin{matrix} CH_2\,OH \\ CH\,OH \\ CH_2\,OH \end{matrix} + \begin{matrix} H\,OCO \cdot C_{17}H_{33} \\ H\,OCO \cdot C_{17}H_{33} \\ H\,OCO \cdot C_{17}H_{33} \end{matrix} = 3H_2O + \begin{matrix} CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33} \\ CH \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33} \\ CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C_{17}H_{33} \end{matrix}$$

Glycerin + Oelsäure = Wasser + Trioleïn.

Cholesterin.

Cholesterin $C_{27}H_{45} . OH$ findet sich in der Galle des Menschen und vieler Tiere, ferner im Blut und in fast allen Flüssigkeiten und Geweben des menschlichen Körpers; besonders reichlich ist es im Gehirn und in den Nerven vorhanden. Die Mehrzahl der Gallensteine des Menschen besteht der Hauptsache nach aus kristallisiertem Cholesterin. Im *Harn* kommt Cholesterin, wohl immer als Begleiter des Fettes bei Chylurie, äußerst selten vor. Im Blutserum hat K. *Hürthle*[1]) als normale Bestandteile *Oelsäure-Cholesterinester* und *Palmitinsäure-Cholesterinester* zuerst aufgefunden und daraus rein dargestellt.

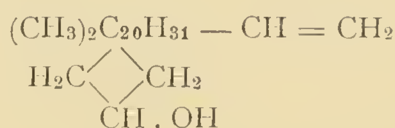
In Harnkonkrementen ist Cholesterin in sehr seltenen Fällen nach-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 331 (1895/96).

gewiesen worden. Horbaczewski fand in einem 25,4 g schweren birnenförmigen, wenig gefärbten Stein aus der Harnblase eines Mädchens über 95 % Cholesterin neben Gallenfarbstoff, phosphorsaurem und kohlensaurem Calcium. (Schulz)[1]).

Eigenschaften. Cholesterin kristallisiert mit 1 Mol. Wasser aus kochendem Alkohol während des Erkaltens in großen, rhombischen Tafeln, die aber besonders aus einer Mischung von Alkohol und Aether beim Verdunsten des letzteren groß und schön werden. Reines Cholesterin kristallisiert aus wasserfreiem Aether, sowie aus Chloroform, Benzol oder Essigäther in wasserfreien, feinen, seidenglänzenden Nadeln. Cholesterin ist unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalilaugen. Auch in kaltem Alkohol ist Cholesterin nur wenig löslich, während es von den bekannten organischen Lösungsmitteln reichlich gelöst wird. In warmem Eisessig löst sich Cholesterin sehr reichlich auf; beim Erkalten einer solchen Lösung scheidet sich in nadelförmigen Krystallen eine Molekülverbindung von Cholesterin und Essigsäure aus, welche durch Zusatz von Alkohol oder Wasser leicht wieder in ihre Komponenten zerlegt wird.

Eine Konstitutionsformel läßt sich für das Cholesterin zur Zeit noch nicht aufstellen. A. Windaus hat auf Grund der Ergebnisse seiner umfangreichen Untersuchungen über Cholesterin die Formel $C_{27}H_{46}O$ zu der Formel



auflösen können. Somit ist wenigstens ein Teil der Konstitution des Cholesterins aufgeklärt.

Darstellung aus Gallensteinen. Man zieht die zerriebenen Gallensteine mit Alkohol-Aethergemisch aus, filtriert ab, läßt das Cholesterin auskristallisieren, kocht es nach dem Abfiltrieren zu seiner Reinigung mit alkoholischer Kalilauge, dampft ein, extrahiert den Rückstand mit Aether und kristallisiert das beim Verdunsten der Aetherlösung zurückbleibende Cholesterin aus Alkohol-Aether um.

Darstellung von Palmitinsäure- und Oelsäure-Cholesterinester aus Blutserum nach K. Hürthle (l. c.).

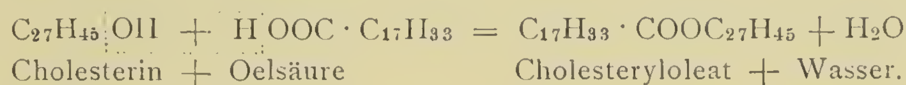
Obwohl der Oelsäure-Cholesterinester sich in Alkohol nur wenig löst, wird er doch aus Blutserum am besten mittelst Alkohol ausgezogen, da er aus diesem am besten kristallisiert, während er aus anderen, wenn auch besseren Lösungsmitteln wie Aether und Chloroform leicht ölig ausfällt oder verharzt.

Blutserum wird mit dem dreifachen Volumen Alkohol von 96 % ausgefällt, gut durchgeschüttelt, über Nacht stehen gelassen, dann die Flüssigkeit auf einer Nutsche abgesaugt. Der Serumrückstand wird mehrere Tage bei 30—40° unter häufigem Umschütteln mit der 3fachen Menge Alkohol extrahiert. Dieser Auszug enthält fast die ganze

[1]) N. Schulz, Neubauer-Huppert's Analyse des Harns, XI. Aufl., 207 (1910).

Menge des Oelsäure-Cholesterinesters $C_{27}H_{45} . O(C_{18}H_{33}O)$, der sich beim Stehenlassen des Auszugs in der Kälte in nadelförmigen Kristallen vom Schmp. 41—45° ausscheidet. Zieht man schließlich den Serumrückstand bei derselben Temperatur mehrere Tage mit Alkohol-Aethergemisch aus, und zwar so oft, als dieses Gemisch noch etwas aus dem Serumrückstand aufnimmt, so kristallisiert dann aus den vereinigten Extrakten Palmitinsäure-Cholesterinester $C_{27}H_{45} . O . C_{16}H_{31}O$ in seideglänzenden, weißen Blättchen vom Schmp. 78°.

In der beschriebenen Weise werden die beiden Cholesterinester aus Serum von Hund, Schwein, Hammel, Rind und Pferd dargestellt; auch aus Hundelymphe wurden sie mehrmals erhalten. Hürthle hat die beiden Cholesterinester auch künstlich dargestellt, nämlich durch Erhitzen von Cholesterin mit Oelsäure, bezw. Palmitinsäure im Oelbade auf 200° während 3 Stunden:



$$C_{27}H_{45}OH + HOOC \cdot C_{17}H_{33} = C_{17}H_{33} \cdot COOC_{27}H_{45} + H_2O$$

Cholesterin + Oelsäure Cholesteryloleat + Wasser.

Nachweis des Cholesterins im Harn.

Man schüttelt den Harn wiederholt mit alkoholfreiem Aether aus und dunstet die filtrierten Aetherauszüge ein oder destilliert aus ihnen den Aether ab, falls größere Mengen der Aetherlösung vorhanden sind. Kleinere Mengen von Fett und Cholesterin lassen sich auch in der Art nachweisen, daß man den Harn unter Zusatz von gebranntem Gips oder Seesand auf dem Wasserbade möglichst zur Trockne eindampft, den Rückstand zerreibt und das Pulver im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mit Aether auszieht. Läßt sich das Cholesterin im Rückstande des Aetherauszuges durch mikroskopische Untersuchung nicht direkt erkennen, so kocht man den Rückstand zur Verseifung von vorhandenem Fett mit alkoholischer Kalilauge einige Zeit auf dem Wasserbade, dampft alsdann die Lösung ein, löst die gebildete Seife in Wasser, schüttelt die Lösung mit Aether aus und dunstet den filtrierten Aetherauszug ein. Einen hierbei bleibenden Rückstand untersucht man auf Cholesterin:

Man löst den Rückstand in möglichst wenig siedendem Alkohol, dampft die filtrierte Lösung auf ein kleines Volumen ein und stellt dann zur Kristallisation bei Seite. Dünne, rhombische Tafeln, die sich hierbei ausscheiden, lassen Cholesterin vermuten. Man führt dann mit den erhaltenen Krystallen die folgenden Reaktionen auf Cholesterin aus.

1. Löst man die Kristalle in einem trockenen Reagensglase in wenig Chloroform und setzt etwa das gleiche Volumen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Chloroformlösung beim Umschütteln blutrot, dann kirschrot bis purpurfarbig, falls Cholesterin vorliegt; diese Färbung hält sich längere Zeit. Gießt man die Chloroformlösung in eine Porzellanschale, so färbt sie sich bald blau, grün, endlich gelb. Die unter der Schwefelsäure stehende Flüssigkeit zeigt gleichzeitig eine starke grüne Fluoreszenz.

2. Löst man Cholesterinkristalle in einem trockenen Probierröhrchen in wenig Chloroform, fügt erst 2 bis 3 Tropfen Essigsäureanhydrid, dann tropfenweise und unter Abkühlen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Lösung erst rosenrot, dann schön blau, um später in grün überzugehen. Liegt sehr wenig Cholesterin vor, so tritt nach einigen Minuten eine ziemlich beständige Grünfärbung auf (Liebermann-Burchard[1]).

3. Die Probe von A. Windaus[2]). Löst man Cholesterin in einem trockenen Probierröhrchen in möglichst wenig Aether und fügt eine Brom-Eisessiglösung (5 g Brom + 100 g Eisessig) bis zur bleibenden Braunfärbung hinzu, so kristallisiert alsbald Cholesterindibromid, $C_{27}H_{46}Br_2O$, in langen Nadeln von Schmp. 124—125° aus. Die Phytosterine geben diese Reaktion nicht.

4. Die Probe von C. Neuberg[3]). Versetzt man eine Lösung von Cholesterin in 1 bis 2 ccm absolutem Alkohol mit einer Spur Rhamnose oder 5-Methylfurfurollösung und unterschichtet dann konzentrierte Schwefelsäure, so tritt an der Berührungsfläche fast sofort ein himbeerfarbener Ring auf, und beim Umschütteln unter Abkühlen färbt sich die ganze Flüssigkeit himbeerfarben und zeigt eventuell nach Verdünnung mit Alkohol einen charakteristischen Absorptionsstreifen, der kurz vor E beginnt und mit b abschneidet. Gallensäure sowie Oleïnsäure geben ähnliche Färbungen.

Mit den Farbenreaktionen des Cholesterins muß man mit seinen Schlußfolgerungen unter Umständen vorsichtig sein, da außer dem typischen Cholesterin auch andere Cholesterine, ferner viele ungesättigte hochmolekulare Alkohole, manche Harzsäuren und Terpene ähnliche Farbenreaktionen geben. Man bestimme daher den Schmelzpunkt (147—148°) von der trockenen Substanz, falls es die Menge gestattet, und führe die Windaus'sche Probe aus, durch welche ein charakteristisches Cholesterinderivat mit scharfem Schmelzpunkt erhalten wird.

Oxalsäure.

Oxalsäure findet sich im Harn des Menschen meist nur in sehr geringer Menge; sie kann aber als ein konstanter normaler Harnbestandteil angesehen werden. Die in dem 24stündigen Harn normalerweise vorkommende Oxalsäuremenge beträgt 5—20 mg. Da bei Verabreichung oxalsäurefreier Kost sowie bei Hunger soviel Oxalsäure ausgeschieden wird, wie bei gewöhnlicher Ernährungsweise, so folgt hieraus, daß die mit dem Harne ausgeschiedene Oxalsäure, wenigstens zum Teil, im intermediären Stoffwechsel erzeugt wird. Oxalsäure in Form von oxalsauren Salzen oder oxalsäurereicher Nahrung (Tee, Spinat, über-

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 18, 1804 (1885).
[2]) Chemiker-Zeitung 30, 1011 (1906).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 335 (1906).

haupt Gemüse) innerlich dargereicht, geht nur zum kleinen Teile in den Harn über; es sind aber auch hierbei Steigerungen der Oxalsäureausscheidung beobachtet worden. Auf jeden Fall besitzt der Körper des Menschen in hohem Grade die Fähigkeit, Oxalsäure zu zerstören, so daß die größte Menge der mit der Nahrung aufgenommenen Oxalsäure nicht in den Harn übergeht. Oxalsäurereichere Nahrungsmittel sind die Gemüse, besonders Spinat, ferner Tee. — Von Substanzen, welche im Tierkörper Oxalsäure bilden, die demnach als Oxalsäurebildner angesehen werden müssen, seien Glykokoll, Glykolsäure und Glyoxylsäure erwähnt. Auch das Allantoin gehört zu den Oxalsäurebildnern, wenigstens ist beim Kaninchen, nach Versuchen von A. M. Luzzato [1]), die Menge der ausgeschiedenen Oxalsäure auf das 8fache gestiegen, als dem Versuchstier 3 g Allantoïn verfüttert wurden. Diese Bildung der Oxalsäure ist verständlich, wenn man bedenkt, daß bei weitgehender Hydrolyse des Allantoïns, nämlich beim Kochen desselben mit Alkalilauge, neben Essigsäure, Kohlensäure und Ammoniak auch Oxalsäure gebildet wird.

Quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn nach W. Autenrieth und Barth [2]).

Dieses Verfahren beruht darauf, daß Oxalsäure aus dem mit Ammoniak alkalisch gemachten Harne durch Chlorkalcium bis auf Spuren als Kalciumoxalat gefällt wird und daß sich die aus dem letzteren mit Salzsäure wieder frei gemachte Oxalsäure mit Hilfe eines Aether-Alkoholgemisches quantitativ ausschütteln läßt.

Ausführung. Man versetzt die Tagesmenge Harn [3]) erst mit Chlorkalciumlösung im Ueberschusse, dann mit Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion, schüttelt tüchtig durch und läßt bis zum anderen Tage (12—20 Stunden) kalt stehen und zwar zweckmäßigerweise in einem Eisschranke. Die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit gießt man durch das doppelte Filter einer nicht zu kleinen Nutsche, bringt dann den Niederschlag darauf und spült diesen mit wenig kaltem Wasser aus. Wendet man ein gutes Filtrierpapier an, so beansprucht das Absaugen der ganzen Flüssigkeitsmenge und Auswaschen des Niederschlags höchstens 1/2 Stunde, selbst wenn 2 Liter und mehr Harn zur Untersuchung vorliegen und das Filtrat wiederholt auf die Nutsche zurückgebracht werden muß, bis es vollkommen klar abfließt. Man bringt nun den gut abgesaugten Niederschlag in ein Becherglas, löst ihn in möglichst wenig warmer Salzsäure, wozu in der Regel 20 bis 25 ccm einer 20%igen Salzsäure gebraucht werden, und schüttelt die erhaltene Lösung in einer geräumigen, mit Glasstöpsel verschließbaren Flasche mit 150 bis 200 ccm Aether, der 5 % absoluten Alkohol enthält, tüchtig aus. Das Ausschütteln der abgetrennten wässerigen, salzsauren Flüssigkeit wird mit 4—5

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 535 (1903).

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 327 (1902).

3) Zweckmäßigerweise nimmt man nicht weniger Harn in Arbeit.

weiteren Portionen von je 150 ccm Aether-Alkoholgemisch wiederholt. Nimmt man zum Ausschütteln eine starkwandige Flasche, so kann man durch Hin- und Herwälzen derselben ohne jede Anstrengung eine gründliche Extraktion der wässerigen Flüssigkeit durch das Aether-Alkoholgemisch leicht bewerkstelligen. Die sämtlichen Aetherauszüge vereinigt man zunächst in einem trockenen Glaskolben und läßt sie etwa 1 Stunde lang ruhig stehen. Hierbei scheiden sich am Boden und an der Gefäßwand des Kolbens meist noch einige Tropfen wässeriger Flüssigkeit aus, von der man die Aetherlösung durch ein trockenes Filter abgießt. Zum Filtrate bringt man ca. 5 ccm Wasser, um beim Erhitzen der Bildung des Oxalsäurediäthylesters entgegenzuwirken, destilliert den Aether und die größte Menge des Alkohols ab, schüttelt die rückständige wässerige Flüssigkeit mit wenig Blutkohle[1]), durch welche fettige, harzige und färbende Stoffe, nicht aber Oxalsäure zurückgehalten werden, filtriert ab, wäscht die Kohle mit wenig Wasser nach und verdampft das meist vollkommen klare und farblose Filtrat in einem Bechergläschen auf dem Wasserbade auf 3 bis 5 ccm. Nun fügt man Chlorcalciumlösung und Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion hinzu, läßt etwa 1/2 Stunde absetzen, säuert mit verdünnter Essigsäure schwach an und läßt kalt stehen. Am folgenden Tage sammelt man das ausgeschiedene Calciumoxalat auf einem aschenfreien Filterchen, wäscht es mit kaltem Wasser aus und führt es in einem gewogenen Platintiegel durch Glühen, zuletzt über einem Gebläse, in Calciumoxyd (CaO) über. Durch Multiplikation des erhaltenen Calciumoxyds mit 1,607 erfährt man die entsprechende Menge an wasserfreier Oxalsäure, da der Quotient $\frac{C_2H_2O_4}{CaO} = \frac{90}{56} = 1,607$ ist.

Statt das Calciumoxalat durch Glühen in Calciumoxyd überzuführen und dieses zu wägen, kann der erhaltene Calciumoxalatniederschlag in heißer verdünnter Schwefelsäure gelöst und die Oxalsäure dieser Lösung mit einer, auf reine Oxalsäure vorher eingestellten, etwa 1/100 n-Kaliumpermanganatlösung titriert werden. Die gravimetrische Methode ist der maßanalytischen zweifelsohne vorzuziehen, da dem Calciumoxalatniederschlage leicht noch Stoffe anhaften können, welche die Kaliumpermanganatlösung gleichfalls reduzieren.

Milchsäure.

Die Aethylidenmilchsäure, $CH_3 \cdot CH(OH) \cdot COOH$, existiert in Uebereinstimmung mit der stereochemischen Theorie in drei Modifikationen, von welchen besonders die Rechts- oder d-Milchsäure, auch Fleisch- oder Paramilchsäure genannt, im menschlichen Organismus vorkommt. Sie ist in den Muskeln, in verschiedenen Organen, wie im Gehirn, im Blut, in der Galle und im Darminhalt nachgewiesen worden. Im Harn kommt sie beim gesunden Menschen nicht vor, vielleicht nach ange-

[1]) Die anzuwendende Blutkohle muß selbstverständlich calciumfrei sein.

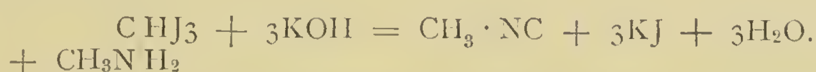
strengter Muskeltätigkeit wie nach sehr anstrengenden Märschen. Ferner ist sie im Harn nachgewiesen bei Erkrankungen der Leber (bei akuter gelber Leberatrophie, zuweilen bei Lebercirrhose), bei Phosphorvergiftung und Vergiftung durch andere Stoffe wie durch Blausäure, Kohlenoxyd, Strychnin, Curare. Araki konnte Milchsäure im Harne nachweisen nach Vergiftung mit Arsenik, Amylnitrit, Cocaïn, Curare, Strychnin, Veratrin. Milchsäure geht, allgemein betrachtet, immer in den Harn über, sobald hochgradiger Sauerstoffmangel im Tierkörper auftritt.

Nachweis im Harne.

Zu ihrem sicheren Nachweise muß die Milchsäure erst aus dem Harne abgeschieden werden. Verfügt man nicht über einen geeigneten Extraktionsapparat, so dampft man eine größere Menge des betreffenden Harns (Tagesmenge) auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen ($^1/_3$ oder $^1/_4$ Vol.) ein, säuert mit Phosphorsäure stark an und schüttelt mit dem gleichen Volumen Aether wiederholt tüchtig aus. Die Extraktion mit neuen Aethermengen ist mindestens 3- bis 4 mal zu wiederholen. Die aufgesammelten Aetherlösungen filtriert man durch ein trockenes Filter und destilliert aus ihnen den Aether ab; es bleibt meist ein dunkel gefärbter Syrup zurück, der außer Milchsäure noch Harnstoff, Hippursäure, Oxalsäure und Phenole enthalten kann. Um diese Stoffe sowie besonders die gefärbten Substanzen zu entfernen, löst man den erhaltenen Rückstand in wenig Wasser, fügt nach Salkowski frisch hergestelltes Bleihydroxyd[1]) hinzu, kocht auf, filtriert heiß ab und leitet in das Filtrat sofort Schwefelwasserstoffgas ein. Mit der vom Schwefelblei abfiltrierten Flüssigeit, aus welcher der Schwefelwasserstoff erst weggekocht wird, kann man die folgenden Proben auf Milchsäure anstellen:

1. Jodoformprobe. Milchsäure gibt beim Erwärmen mit Jod-Jodkaliumlösung und Kalilauge Jodoform.

2. Isonitrilprobe von Vournasos[2]). Man kocht die mit 10%iger Kalilauge stark alkalisch gemachte Milchsäurelösung einige Minuten, fügt 1—2 ccm eines Gemenges von Jodjodkaliumlösung und Methylamin hinzu und kocht nochmals auf. Bei Vorhandensein von Milchsäure gibt das aus der Milchsäure mit Jod und Kalilauge zunächst gebildete Jodoform mit dem Methylamin das widerlich riechende Methylisonitril:



$$CHJ_3 + 3KOH = CH_3 \cdot NC + 3KJ + 3H_2O.$$
$$+ CH_3NH_2$$

Bereitung des in blauer Flasche aufzubewahrenden Reagenses:

1 g Jod + 0,5 g Jodkalium + 50 ccm Wasser + 0,5 g Methylamin.

Statt des Methylamins läßt sich die ebenfalls primäre Base Anilin verwenden, aus welcher das ebenfalls sehr widerlich riechende

---

[1]) Durch Ausfällen einer Bleinitrat- oder Bleiacetatlösung mit Ammoniak, Abfiltrieren und Auswaschen des gebildeten Bleihydroxyniederschlags dargestellt.

[2]) Zeitschr. f. angewandte Chemie 15, 172 (1902).

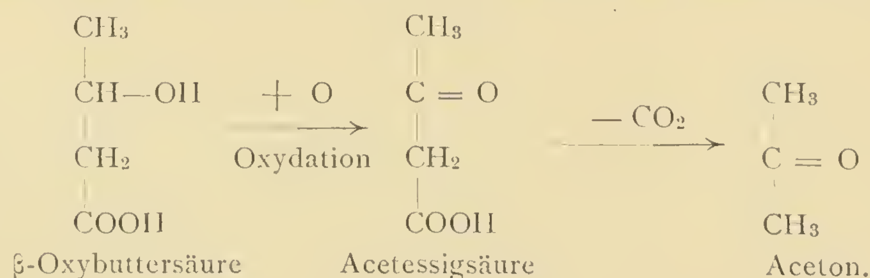
Phenylisonitril, C_6H_5NC, gebildet wird. Diese Proben sind recht empfindlich; eine 0,05 %ige Milchsäurelösung gibt sie noch deutlich.

3. Die Uffelmannsche Probe. Verdünnt man eine Eisenchloridlösung mit Wasser so stark, daß sie gerade noch gelblich gefärbt erscheint, und fügt dann eine, selbst nur Spuren von Milchsäure enthaltende Lösung hinzu, so färbt sich das Gemisch intensiv gelb. (Nicht charakteristisch). Man kann auch eine Eisenchloridcarbollösung verwenden, hergestellt aus einem 2%igen Carbolwasser mittels wenig Eisenchloridlösung. Die blauviolette Färbung dieser Mischung geht auf Zusatz einer milchsäurehaltigen Lösung ebenfalls in Gelb über.

4. Die Probe von Hopkins und Fletscher[1]). Man bringt in einem Reagensglase zu 5 ccm konz. Schwefelsäure einen Tropfen einer gesättigten Kupfersulfatlösung und darauf einige Tropfen der zu prüfenden Lösung, schüttelt um und stellt das Reagensglas für 1—2 Minuten in lebhaft siedendes Wasser. Dann wird rasch abgekühlt und nach Zufügen von 3 Tropfen einer alkoholischen Thiophenlösung — 10 bis 20 Tropfen Thiophen in 100 ccm Alkohol — in das siedende Wasser zurückgebracht. Bei Gegenwart von Milchsäure nimmt das Gemisch eine kirschrote Färbung an, die aber nur dann bestehen bleibt, wenn das Reagensglas sofort abgekühlt wird.

Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure

bilden zusammen die sogenannten »Acetonkörper« des Harns, die sich besonders bei Diabetes, aber auch bei verschiedenen anderen Krankheiten im Harne vorfinden können. Nach v. Jaksch ist Aceton ein normaler Harnbestandteil, der im Harn des gesunden Menschen freilich nur in Spuren, etwa zu 0,01 g. in der 24stündigen Harnmenge enthalten ist. Von den drei Acetonkörpern kann man die β-Oxybuttersäure als die Muttersubstanz der beiden anderen Substanzen ansehen. In geringer Menge dem Tierkörper einverleibt, wird β-Oxybuttersäure verbrannt; wird aber die Säure in größerer Menge eingeführt, so wird ein Teil derselben in Acetessigsäure umgewandelt, die dann mit dem Harn ausgeschieden wird; die sekundäre Alkoholsäure wird zur zugehörigen Ketonsäure, der Acetessigsäure, oxydiert und diese Säure zerfällt nun sehr leicht in Aceton und Kohlensäure. Die nahen Beziehungen der drei Acetonkörper zu einander geht aus ihren Konstitutionsformeln hervor:



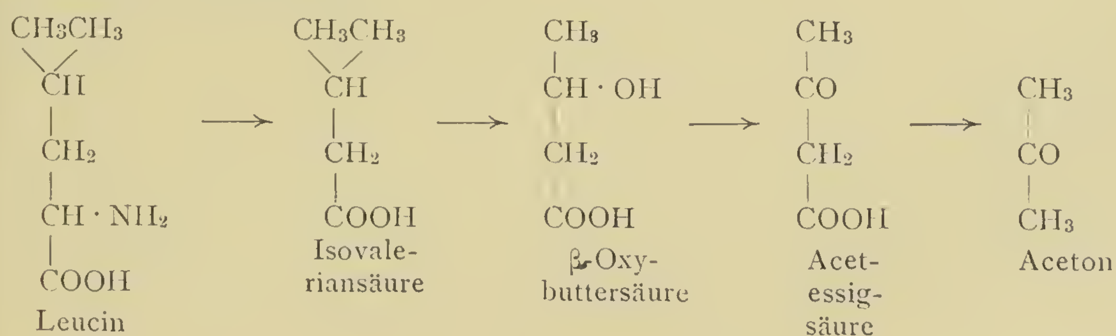
β-Oxybuttersäure Acetessigsäure Aceton.

Aceton wird zum großen Teil im Tierkörper verbrannt; nur zu einem

[1]) Journ. of Physiol. 35, 247 (1907)

sehr geringen Teile wird es durch die Nieren und auch die Lungen ausgeschieden. Der Organismus besitzt also zweifelsohne das Vermögen, Aceton umzusetzen; doch ist dieses Vermögen nicht ausreichend, um Acetonurie gänzlich zu verhindern, wenn in den zirkulierenden Flüssigkeiten des Körpers mehr als die normalen Spuren von Aceton vorhanden sind. Nach H. Chr. Geelmuyden[1]) ist daher die Ursache der Acetonurie nicht darin zu suchen, daß dieses Vermögen weniger wirksam wird, als vielmehr in einer gesteigerten Bildung von Aceton. — Man ist wohl zu der Annahme berechtigt, daß β-Oxybuttersäure zu den normalen, also physiologischen Stoffwechselprodukten gehört, daß sie normalerweise über Acetessigsäure und Aceton vollständig abgebaut wird, daß aber ihre Menge beim Diabetes abnorm gesteigert oder aber ihre vollständige Verbrennung erschwert ist, so daß dann zuerst Aceton und Acetessigsäure und in schweren Fällen auch β-Oxybuttersäure im Harn auftreten können.

Als die Muttersubstanzen, aus welchen die Acetonkörper im Organismus hervorgehen, kommen die Eiweißstoffe und die Fette in Betracht; sie sind als die eigentlichen Acetonbildner zu betrachten. Zu Gunsten der ersteren Annahme spricht die Tatsache, daß Aceton als Oxydationsprodukt aus Eiweiß und leimgebenden Substanzen erhalten wurde, ferner die Ergebnisse der umfassenden Arbeiten von Embden und seinen Mitarbeitern, daß die aus dem Eiweiß hervorgehenden Aminosäuren Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, ferner Phenyl-α-Milchsäure und Homogentisinsäure in der Leber Aceton bilden. Besonders Leucin scheint ein Acetonbildner zu sein, oder wie man auch sagt, »ketoplastisch« wirken zu können und zwar mit Acetessigsäure und wahrscheinlich auch mit β-Oxybuttersäure als Zwischenstufen. — Im Hinblick darauf, daß Leucin und Isovaleriansäure bei Zuckerkranken die Ausscheidung der β-Oxybuttersäure stark vermehren (Baer, Blum), ist man zu der Annahme berechtigt, daß β-Oxybuttersäure, mit der Isovaleriansäure als Zwischenstufe, aus Leucin hervorgehen kann. Die Zwischenstufen des aus Leucin hervorgehenden Acetons wären dann aller Wahrscheinlichkeit nach die folgenden:



Fette und Fettsäuren als Acetonbildner. Wenn es auch kaum mehr zweifelhaft erscheinen dürfte, daß die Acetonkörper im Tierkörper aus Eiweiß oder deren Abbauprodukten hervorgehen können,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 431 (1897).

so sprechen doch verschiedene Tatsachen gegen die ausschließliche Bildung derselben aus Eiweißsubstanzen. Die Acetonausscheidung wächst nämlich nicht stetig mit steigenden Eiweißmengen, im Gegenteil setzt die Erhöhung der letzteren über ein mittleres Maß hinaus sogar die Acetonausscheidung herab. — Es kommen außer den Eiweißstoffen nur noch die Fette oder richtiger gesagt, die in den letzteren enthaltenen Fettsäuren als Acetonbildner in Betracht, da ja die andere Komponente der Fette, das Glycerin, sogar »antiketoplastisch« wirkt. H. Chr. Geelmuyden (l. A.) ist auf Grund seiner ausführlichen Untersuchungen zu dem Schlusse gekommen: »daß bei reiner Eiweißnahrung schwache Acetonurie entsteht, welche bei steigenden Mengen Eiweiß in der Nahrung sogar abnimmt. Bei absolutem Hunger, reiner Fettnahrung, oder gemischter Eiweiß- und Fettnahrung mit großem Fettgehalt entsteht eine bedeutende Acetonurie. Umsatz von Fett im Körper scheint die wesentliche Ursache der Acetonurie zu sein, und, in Anbetracht dessen, daß bei absolutem Hunger eine hochgradige Acetonurie entsteht, scheint sich der Umsatz von Körperfett und Nahrungsfett in dieser Beziehung gleich zu verhalten«. Nach Embden und Marx[1]) sind nur Normalfettsäuren mit einer geraden Kohlenstoffatomzahl Acetonbildner; so ist die n-Buttersäure ein kräftiger Acetonbildner. Höchst wahrscheinlich werden hierbei von den höheren Homologen der Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffatomzahl immer zunächst nur zwei Kohlenstoffatome abgespalten; zugunsten dieser Anschauung sprechen die Ergebnisse von Durchblutungsversuchen, welche Embden und Marx angestellt haben, nach welchen aus der normalen Dekansäure bis zur normalen Buttersäure über die β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure in der Leber Aceton gebildet wird:



$$CH_3 \cdot CH_2 . CH_2 \cdot COOH + O = CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 . COOH$$
$$CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 . COOH + O = CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH + H_2O$$
$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 . COOH = CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + CO_2.$$

Bei all diesen Versuchen waren die betreffenden Fettsäuren mit Ammoniak genau neutralisiert; die Durchblutungszeit betrug 75 Minuten. Bemerkenswert ist, daß auch bei der künstlichen Durchblutung der lebensfrischen Leber mit normalem Blute ebenfalls Aceton gebildet wird.

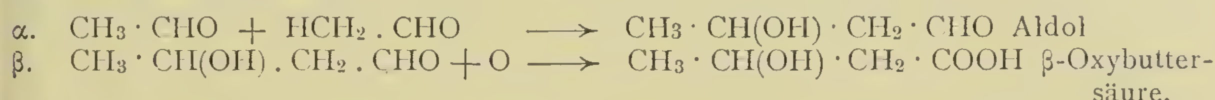
Nach Embden und Engel[2]) lassen alle Substanzen, die bei der Leberdurchblutung Aceton bilden, auch β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure entstehen[3]). Unterschuungen beim schweren Diabetes haben ergeben, daß n-Buttersäure in β-Oxybuttersäure übergehen kann.

[1]) Hofmeisters Beiträge 11, 318 (1908).

[2]) Hofmeisters Beiträge 11, 323 (1908).

[3]) Interessant ist die von G. Embden beobachtete Tatsache, daß das natürliche l-Caseinleucin unter den gleichen Bedingungen, unter welchen sich das synthetische Leucin als ein kräftiger Acetonbildner erwies, in der Leber kein Aceton bildete, während das d-Leucin wieder ein ausgezeichneter Acetonbildner ist.

Hinsichtlich der β-Oxybuttersäure muß schließlich auch an eine synthetische Bildung im Tierkörper gedacht werden, und zwar ist eine solche Synthese der Säure aus Acetaldehyd von vornherein nicht ganz auszuschließen, wenn auch nicht sehr wahrscheinlich. In dieser Hinsicht sind die von Friedmann[1]) ausgeführten Versuche, daß aus Aldol bei Durchblutungsversuchen in der Leber Aceton entsteht, von Interesse. Aus dem, durch einfache Kondensation aus Acetaldehyd entstehenden Aldol (α) könnte durch einen Oxydationsprozeß β-Oxybuttersäure (β) gebildet werden:



α. $CH_3 \cdot CHO + HCH_2 . CHO \longrightarrow CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot CHO$ Aldol
β. $CH_3 \cdot CH(OH) . CH_2 . CHO + O \longrightarrow CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot COOH$ β-Oxybuttersäure.

Wenn nun auch die Leber als ein acetonkörperbildendes Organ angesehen werden muß, so darf nicht verschwiegen werden, daß der Leber auch eine mächtige aceton- und acetessigsäurezerstörende Wirkung zukommt.

Kohlenhydrate und Acetonkörper. Kohlenhydrate kommen für die Acetonkörperbildung nicht in Betracht. Im Gegenteil, eine Acetonkörperausscheidung kommt zu Stande, wenn dem Tierkörper mit der Nahrung nicht hinreichende Mengen Kohlenhydrate zugeführt oder aber die Kohlenhydrate nicht ausgenutzt werden. Aehnliche Verhältnisse kommen im Diabetes wie auch beim Hungern vor. Umgekehrt kann sogar eine reichliche Zufuhr von Kohlehydraten, wenn also im Organismus reichlich Kohlehydrate umgesetzt werden, die Ausscheidung der Acetonkörper stark herabsetzen oder sogar zum Verschwinden bringen. Die Nahrung muß freilich schon bedeutende Mengen Kohlehydrate enthalten, für den erwachsenen Menschen 100—200 g, damit keine Acetonurie entstehen soll (Geelmuyden). Die Kohlehydrate wirken somit als »antiketoplastische« Substanzen; verschiedene andere Stoffe wie Glycerin, Milchsäure, Weinsäure, Zitronensäure wirken in gleichem Sinne antiketoplastisch.

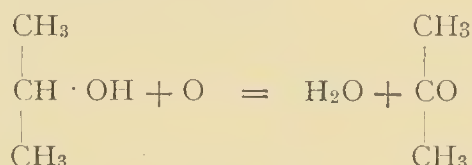
Nach H. Chr. Geelmuyden[2]) ist der Gehalt der Organe an Aceton und β-Oxybuttersäure in Diabetikerleichen über die Norm stark vermehrt, und zwar enthält die Leber am meisten β-Oxybuttersäure und am wenigsten Aceton. — Nach Gunnar Fassner[3]) folgt den Mahlzeiten regelmäßig eine Vermehrung des Acetons und der β-Oxybuttersäure; die hierbei beobachteten Steigerungen der Acetonkörperausscheidung beruht auf der Zufuhr von Nahrungsfett. — Beim Menschen entsteht im gesunden Zustande wie auch bei leichtem Diabetes, wie auch im Hundekörper aus Acetessigsäure l-β-Oxybuttersäure (L. Blum[4]). Beim Abbau der Fettsäuren tritt beim Tier intermediär Acetessigsäure auf, aus welcher

[1]) Hofmeisters Beiträge 11, 202 (1908).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 255 (1908).
[3]) Skandin. Archiv f. Physiologie 22, 349 und Chemisches Centralblatt 1909. II. 1759.
[4]) Münchener medizinische Wochenschrift 57, 683 (1910).

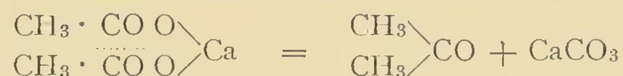
sekundär die linksdrehende Modifikation der β-Oxybuttersäure hervorgeht. Die überlebende Leber vom Hunde vermag Acetessigsäure zu l-β-Oxybuttersäure zu reduzieren. Nach H. D. Dakin[1]) muß man in der Leber die Existenz zweier, antagonistisch wirkender Enzyme annehmen, nämlich eine Oxydase, welche β-Oxybuttersäure zu Acetessigsäure oxydiert, und eine Reduktase, welche im entgegengesetzten Sinne wirkt, indem sie Acetessigsäure zu β-Oxybuttersäure reduziert. Die Reduktion scheint leichter zu erfolgen als der umgekehrte Prozeß, die Oxydation. Die unter pathologischen Verhältnissen im Harne des Menschen auftretende β-Oxybuttersäure dürfte ihren Ursprung nicht in der Oxydation von Buttersäure, wie bisher gewöhnlich angenommen wurde, haben, sondern in der Reduktion der Acetessigsäure. Auch im Tierkörper finden derartige Reduktionen statt. Wurde Hunden und Katzen intravenös acetessigsaures Natrium in 8%iger Lösung injiciert, so ließen sich im Harn der betreffenden Versuchstiere beträchtliche Mengen l-β-Oxybuttersäure nachweisen.

Aceton.

Aceton bildet eine farblose, eigentümlich, aber nicht unangenehm riechende Flüssigkeit vom spez. Gew. 0,792, die sich mit Wasser, Alkohol und Aether in jedem Verhältnisse mischt und die bei 56,5° siedet. Es ist nicht giftig. Aceton ist für viele Substanzen ein vorzügliches Lösungsmittel. Es entsteht durch Oxydation des sekundären Propylalkohols oder Isopropylalkohols:



wie auch durch trockene Destillation von essigsaurem Calcium:



Technisch wird Aceton aus rohem Holzgeist gewonnen.

Nachweis des Acetons im Harn.

Bei Abwesenheit von Acetessigsäure. Zum sicheren Nachweis des Acetons destilliert man aus einem geräumigen Glaskolben, der höchstens zu 1/4 mit Harn gefüllt sein darf, 200 bis 250 ccm, des mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuerten Harns und sammelt 20 bis 30 ccm Destillat auf. Zu Beginn der Destillation darf der Destillationskolben nur mit ganz kleiner Flamme erhitzt werden, weil viele Harne beim Kochen stark schäumen und daher beim Destillieren leicht in die Vorlage übersteigen können. Mit dem erhaltenen Destillate stellt man dann die folgenden Proben auf Aceton an.

[1]) Journ. of Biol. Chem. 8, 97 (1910).

1. Die Lieben'sche Jodoformprobe. Man versetzt das Destillat erst mit einigen ccm Jodjodkaliumlösung, dann tropfenweise mit Kalilauge; eine auftretende gelblichweiße Fällung von Jodoform zeigt dann Aceton an. Das Jodoform scheidet sich hierbei meist amorph, selten kristallinisch und dann in sechsseitigen Täfelchen und Sternen aus; läßt man die Lösung des amorphen Jodoforms in alkoholfreiem Aether auf einem Objektträger eindunsten, so bleibt das Jodoform in sechsseitigem Blättchen zurück. Die Lieben'sche Jodoformprobe ist zwar sehr empfindlich, aber für Aceton nicht charakteristisch, denn unter den gleichen Bedingungen bilden auch Aethylalkohol und Acetaldehyd Jodoform.

Die Empfindlichkeit der Probe geht aus folgenden Versuchen hervor; für jeden der Versuche wurden 10 ccm einer wässerigen Acetonlösung benutzt.

Verdünnung	1 : 15 000 :	Sofort Ausscheidung von Jodoform.
,,	1 : 25 000 :	Trübung, tritt innerhalb weniger Sekunden ein.
,,	1 : 50 000 :	,, ,, ,, 2—3 Minuten ein.
,,	1 : 100 000 :	Nach etwa 1/2 Stunde zwar schwache, aber noch deutliche Reaktion.

Es läßt sich demnach mit Hilfe der Jodoformprobe 0,1 mg Aceton, das in 10 ccm Wasser gelöst ist, noch sicher nachweisen.

Will man von vornherein eine Verwechslung des Acetons mit Alkohol oder Acetaldehyd ausschließen, so führt man die Jodoformprobe in der von Gunning[1]) angegebenen Weise aus, indem man ca. 10 ccm des Harndestillats mit 10 Tropfen Ammoniak und mit 5—10 Tropfen alkoholischer Jodlösung, oder nach le Nobel bis zur schwachen Gelbfärbung mit einer Lösung von Jod in Jodammoniumlösung versetzt. Neben Jodoform bildet sich hierbei ein schwarzer, aus Jodstickstoff bestehender Niederschlag, der aber beim Stehen der Probe allmählich verschwindet, so daß dann das reine Jodoform zum Vorschein kommt. Bei kleineren Acetonmengen dauert es manchmal 1 bis 2 Stunden und noch länger, bis der Jodstickstoff vollständig gelöst ist. — Die Gunning'sche Probe ist zwar nicht ganz so empfindlich wie die Lieben'sche Jodoformprobe, sie hat aber vor dieser den großen Vorzug, daß sie eine Verwechslung des Acetons mit Alkohol oder Acetaldehyd ausschließt.

2. Die Legal'sche Probe. Man versetzt 5 bis 10 ccm des Harndestillates mit einigen Tropfen frisch bereiteter Nitroprussidnatriumlösung sowie tropfenweise mit Kali- oder Natronlauge; enthält das Destillat Aceton, so nimmt das Gemisch eine rote oder mehr rotgelbe, bald in Gelb übergehende Färbung an. Säuert man jetzt mit Essigsäure an, so tritt eine karminrote, bei Gegenwart von viel Aceton eine mehr purpurrote Färbung auf. Die Legal'sche Acetonprobe ist nicht so empfindlich wie die Lieben'sche Probe.

Bemerkungen. Acetessigsäure und Kreatinin, die sich freilich als solche nicht im Harndestillate vorfinden können, geben die Probe ebenfalls; nur kommt bei

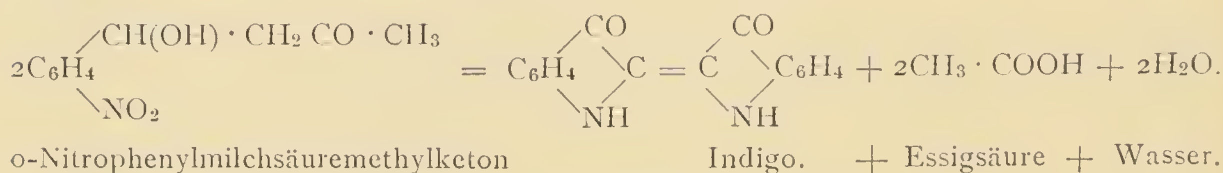
[1]) Journ. de Pharm. et de Chim. [5] 4, 130 (1881).

dem letzteren beim Ansäuern mit Essigsäure eine andere Färbung zum Vorschein. — p-Kresol $C_6H_4(CH_3)OH$, das sich unter Umständen im Harndestillate vorfindet, gibt mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge eine schwache rotgelbe Färbung, die mit Essigsäure in Rosa übergeht. — Acetaldehyd gibt die Legalsche Probe wie das Aceton.

3. Die Pentzoldt'sche Indigoprobe[1]) beruht auf der Bildung von Indigo beim Schütteln einer wässerigen Acetonlösung mit einer ebenfalls wässerigen Lösung von Ortho-Nitrobenzaldehyd $NO_2 . C_6H_4 . CH : O$ und Natronlauge; hierbei entsteht zunächst O-Nitrophenylmilchsäuremethylketon:

$$(1,2)NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH : O + HCH_2 \cdot CO \cdot CH_3 = NO_2 . C_6H_4 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_3,$$

welches in der zweiten Phase (2 Mol.) in Indigo, Essigsäure und Wasser zerfällt:



o-Nitrophenylmilchsäuremethylketon Indigo. + Essigsäure + Wasser.

Man löst einige Kriställchen o-Nitrobenzaldehyd in heißem Wasser auf, läßt die Lösung erkalten und schüttelt sie dann mit dem Harndestillat und Natronlauge tüchtig durch. Bei Vorhandensein von Aceton färbt sich das Gemisch erst gelb, dann grün und blaugrün, und beim kräftigen Ausschütteln mit wenig Chloroform färbt sich dieses durch gelösten Indigo blau. Zweckmäßigerweise schüttelt man die Probe erst nach 1 bis 2 Stunden langem Stehen mit Chloroform aus. — Alkohol gibt die Indigoprobe nicht, wohl aber Acetaldehyd sowie Acetessigsäure.

4. Die Reynold'sche Quecksilberoxydprobe[2]) beruht auf der Eigenschaft des Acetons frisch gefälltes Quecksilberoxyd zu lösen.

Man versetzt 5 bis 6 Tropfen wässerige Quecksilberchloridlösung erst mit alkoholischer Kalilauge, dann mit 5—10 ccm Harndestillat, schüttelt tüchtig durch und filtriert durch ein Doppelfilterchen, indem man das Filtrat so oft aufs Filter zurückgießt, bis es wasserklar, also frei von suspendiertem Quecksilberoxyd, abfließt. Ueber dieses klare Filtrat schichtet man vorsichtig einige ccm Schwefelammonium. Bei Gegenwart von Aceton im Harndestillat entsteht an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeitsschichten eine schwarze Zone (HgS). — Bohrisch[3]) läßt das klare Filtrat vor dem Ueberschichten mit Schwefelammonium mit $^1/_4$ n-Salzsäure ansäuern. — Auch Acetaldehyd, nicht aber Alkohol, löst Quecksilberoxyd auf und gibt somit ebenfalls die Reynold'sche Probe.

5. Die Hydroxylaminprobe von O. Piloty und A. Stock[4]).

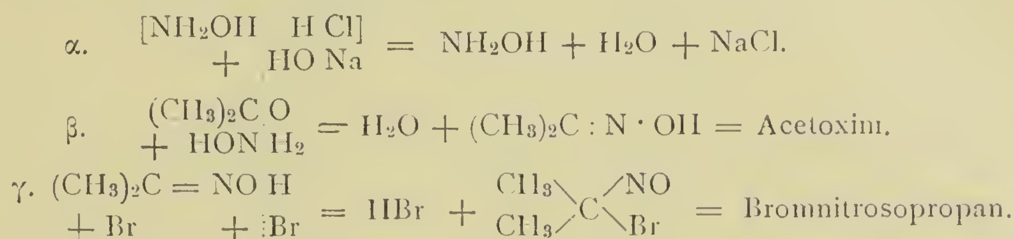
[1]) Archiv f. klinische Medizin 34, 132 (1883).

[2]) Proceedings roy. Soc. 19, 431 (1871).

[3]) Pharmaz. Zentralhalle 48 (1907).

[4]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3093 (1902) sowie A. Stock, Dissertation Berlin 1899. Vgl. ferner O. Piloty, Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 31, 452 (1898).

Hydroxylamin, aus seinem Chlorhydrat mit Natronlauge frei gemacht (α), kondensiert sich mit Aceton zu Acetoxim (β), das mit Brom blaues Bromnitrosopropan (γ) liefert:

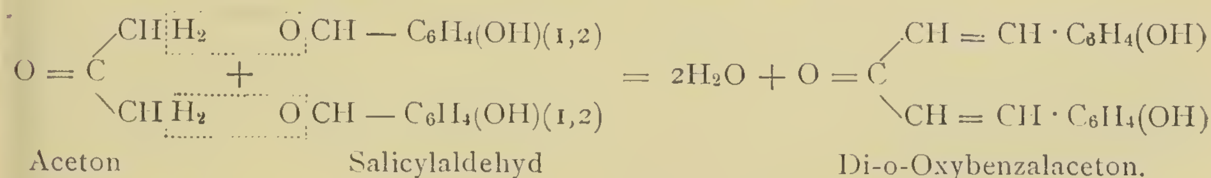


Nach O. Piloty ist Bromnitrosopropan eine leicht bewegliche Flüssigkeit von ultramarinblauer Farbe und stechendem, höchst unangenehmem Geruche.

Man versetzt 10 ccm des Destillats mit je 1 Tropfen einer 10 %igen Hydroxylaminchlorhydratlösung und Natronlauge (von 5 % NaOH), sowie mit 1 bis 2 Tropfen Pyridin, überschichtet mit 1 ccm Aether und gibt unter Umschütteln soviel Bromwasser hinzu, daß sich der Aether deutlich gelb oder grün färbt. Schüttelt man jetzt zur Zerstörung der gelben Pyridinverbindung mit etwa 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd, so nimmt der Aether eine dauernde blaue Färbung an, wenn das Destillat acetonhaltig gewesen ist. Die Empfindlichkeit der Probe ist groß und wird durch Alkohol nicht verringert. Bei einer Verdünnung der Acetonlösung von 1 : 5000 tritt die Probe noch deutlich ein; erst bei einer solchen von 1 : 10 000 wird das Resultat unsicher.

Vereinfachung der Hydroxylaminprobe nach Fröhner[1]). Man versetzt 5 ccm Harndestillat erst mit einem Kriställchen von salzsaurem Hydroxylamin, dann mit wenig Chlorkalklösung und schließlich mit Aether, der sich bei Vorhandensein von Aceton blau färbt; 1 mg Aceton läßt sich auf diese Weise noch nachweisen. Acetaldehyd und Acetessigsäure verhalten sich bei dieser Probe wie Aceton.

6. Die Salicylaldehydprobe von R. Fabinyi und Frommer. Aceton (1 Mol.) kondensiert sich bei Gegenwart von konzentrierter Kalilauge mit Salicylaldehyd (2 Mol.) zu dem karminrot gefärbten Kaliumsalz des Di-o-oxydibenzalacetons (R. Fabinyi[2]).



Nach Frommer versetzt man 10 ccm des Harndestillats (oder des Harns) mit 1 g festem Aetzkali, sowie, ohne dessen Auflösung abzuwarten, mit 10 Tropfen Salicylaldehyd und erwärmt auf 70°. Enthält der Harn oder dessen Destillat Aceton, so bildet sich an der Berührungsstelle beider Schichten ein purpurroter Ring. Andere Harnbestandteile sollen diese Probe nicht geben, auch nicht Acetessigsäure, so daß für

[1]) Deutsche med. Wochenschrift 1901. 27, 79.

[2]) Chemisches Centralblatt 1900. II. 302.

diese Acetonprobe der Harn direkt verwendet werden kann. Nach Bohrisch gibt aber eine 1%ige Acetessigsäurelösung ebenfalls einen purpurroten Ring wie Aceton.

7. Die Vanillin-Salzsäureprobe von L. Rosenthaler[1]. Eine große Zahl, vielleicht sogar alle Ketone der aliphatischen Reihe geben mit Vanillin-Salzsäurereagens Färbungen; mit Aceton ist die Färbung besonders stark. — Man mischt 3 ccm einer 1%igen Lösung von Vanillin in Salzsäure mit 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure, gibt unter Umschütteln 3 Tropfen des Harndestillats hinzu und erwärmt im kochenden Wasserbade. Bei Vorhandensein von Aceton im Destillat färbt sich das Gemisch erst grün, dann violett. Acetaldehyd und Acetessigsäure geben ebenfalls die Rosenthaler'sche Probe.

Von allen Acetonproben schließt die Gunning'sche Jodoformprobe eine Verwechslung des Acetons mit Alkohol oder Acetaldehyd von vornherein aus. Die Gunning'sche Probe ist daher am einwandfreiesten. Immerhin empfiehlt es sich, das erhaltene Harndestillat mit Hilfe mehrerer Proben auf einen etwaigen Acetongehalt zu untersuchen.

Bei Anwesenheit von Acetessigsäure. Statt das Aceton aus dem Harne abzudestillieren, kann es auch mit alkohol- und acetonfreiem Aether[2] ausgeschüttelt werden; in dieser Weise arbeitet man, wenn neben Acetessigsäure Aceton nachgewiesen werden soll. — Man versetzt 50 bis 100 ccm des betreffenden Harns mit Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion, schüttelt das Gemisch in einem Scheidetrichter mit 20 bis 30 ccm alkohol- und acetonfreiem Aether aus, trennt die klare Aetherlösung, die jetzt etwa im Harn vorhandenes Aceton enthält, ab und schüttelt sie mit 10 bis 20 ccm reinem Wasser aus. Mit der ebenfalls in einem Scheidetrichter abgetrennten wässerigen Lösung stellt man dann die obigen Proben auf Aceton an. Das Wasser entzieht hierbei dem Aether etwa vorhandenes Aceton.

Die quantitativen Bestimmungen des Acetons im Harn.

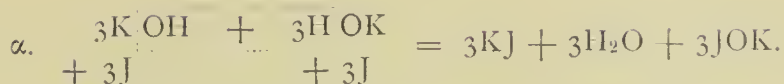
1. Die Bestimmung nach J. Messinger[3].

Das aus dem Harne abdestillierte Aceton wird in alkalischer Lösung durch überschüssige $^1/_{10}$ n-Jodlösung in Jodoform übergeführt und der Ueberschuß des Jods nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung zurückgemessen. Jod gibt mit kalter Kalilauge Jodkalium und unterjodigsaures Kalium (α), von welchen das letztere mit Aceton, höchst wahrscheinlich mit Trijodaceton als Zwischenstufe (β), Jodoform und essigsaures Kalium bildet:

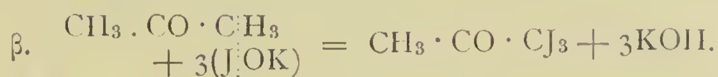
[1] Zeitschr. f. analyt. Chem. 44, 292 (1905).

[2] Man schüttele eine Probe des in Frage kommenden Aethers gut mit Wasser aus und untersuche den in einem Scheidetrichter abgetrennten wässerigen Auszug mit Jod und Kalilauge auf jodoformbildende Substanzen.

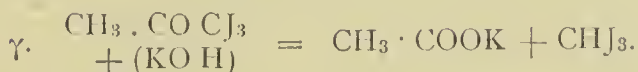
[3] Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 21, 3366 (1888).



$$\alpha.\quad \begin{matrix} 3KOH \\ +3J \end{matrix} + \begin{matrix} 3HOK \\ +3J \end{matrix} = 3KJ + 3H_2O + 3JOK.$$



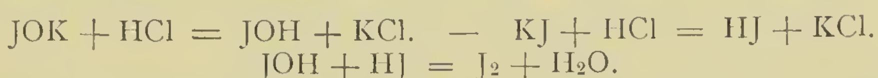
$$\beta.\quad \begin{matrix} CH_3 . CO \cdot CH_3 \\ +3(JOK) \end{matrix} = CH_3 \cdot CO \cdot CJ_3 + 3KOH.$$



$$\gamma.\quad \begin{matrix} CH_3 . CO\, CJ_3 \\ +(KOH) \end{matrix} = CH_3 \cdot COOK + CHJ_3.$$

1 Mol. Aceton liefert somit 1 Mol. Jodoform; für die Bildung des letzteren werden demnach 6 Atome Jod verbraucht.

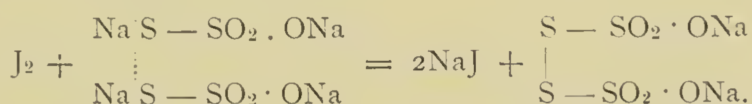
Säuert man das Reaktionsgemisch nach beendeter Reaktion an, so wird aus dem noch vorhandenen unterjodigsauren Kalium (1 Mol.) unterjodige Säure und aus der äquivalenten Menge Jodkalium (1 Mol.) Jodwasserstoffsäure frei, die zusammen Jod und Wasser geben:



$$JOK + HCl = JOH + KCl. \quad - \quad KJ + HCl = HJ + KCl.$$
$$JOH + HJ = J_2 + H_2O.$$

Dasjenige Jodkalium aber, welches dem vom Aceton verbrauchten unterjodigsauren Kalium entspricht (Gleichungen α und β), kann aber beim Ansäuern kein Jod abscheiden. Der Gesamtverbrauch an Jod für 1 Molekül Aceton beträgt demnach 6 Atome Jod.

Das beim Ansäuern frei gewordene Jod wird schließlich mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung[1]) bestimmt:



$$J_2 + \begin{matrix} NaS - SO_2 . ONa \\ \vdots \\ NaS - SO_2 \cdot ONa \end{matrix} = 2NaJ + \begin{matrix} S - SO_2 \cdot ONa \\ | \\ S - SO_2 \cdot ONa. \end{matrix}$$

Das Harndestillat, in welchem das Aceton jodometrisch bestimmt werden soll, darf Phenole, Ammoniak, salpetrige Säure und Ameisensäure nicht enthalten. Phenol bildet nämlich mit dem Jod Trijodphenol, Ammoniak aber Jodstickstoff und Ameisensäure wird unter Jodwasserstoffbildung oxydiert; in all diesen Fällen wird also Jod verbraucht, während die salpetrige Säure aus dem Jodkalium Jod frei macht. Diese Fehlerquellen werden ausgeschlossen, wenn man den Harn unter Zusatz von Essigsäure destilliert, wobei ein phenolfreies Destillat erhalten wird, das aber noch geringe Mengen Ammoniak enthält. Dieses wird entfernt, wenn man das erst erhaltene Destillat unter Zugabe von 8-fach verdünnter Schwefelsäure nochmals destilliert. — Salpetrige Säure, daran erkenntlich, daß das angesäuerte Destillat sich mit Jodkaliumstärkelösung bläut, sowie die Ameisensäure können durch Zusatz von Calciumcarbonat zum ersten Destillat beseitigt werden. — Geelmuyden destilliert nur einmal, und zwar unter Zusatz von Schwefelsäure, da bei jeder Destillation doch etwas Aceton verloren geht. Der durch das zweimalige oder gar dreimalige Destillieren bedingte Fehler kann größer werden, als der durch vorhandenes Phenol verursachte. Für zuckerfreie Harne ist diese Vereinfachung der einmaligen Destillation zulässig, nicht aber für Zuckerharne.

---

[1]) Ueber die Titerstellung der $^1/_{10}$n-Natriumthiosulfatlösung vgl. den betreffenden Abschnitt meiner »Quantitativen chemischen Analyse«, II. Aufl. 1909.

Ausführung. Man verwendet von acetonarmen Harnen[1]) 500 ccm, von Fieberharnen und anderen, voraussichtlich acetonreicheren Harnen nur 100 ccm für eine jede Acetonbestimmung und fügt auf je 100 ccm des Harns 2 ccm 50% ige Essigsäure hinzu. Die Destillation nehme man in einem recht geräumigen Glaskolben vor, der höchstens zu 1/3 mit dem Harn angefüllt ist, weil viele Harne beim Kochen stark schäumen und dann in die Vorlage übersteigen können. Um Siedeverzug und ein stärkeres Stoßen während der Destillation zu verhindern, bringt man einige Tonstückchen oder Bimsteinstücke in den Destillationskolben. Als Vorlage dient eine mit einem doppelt durchbohrten Stöpsel versehene Kochflasche, durch dessen eine Oeffnung der Vorstoß des Destillationsapparates führt und durch dessen andere Oeffnung die Vorlage noch mit einer Péligot'schen Röhre oder einem anderen, mit Wasser gefüllten Kugelapparate verbunden ist. Die Vorlage wird mit Eis gut gekühlt. Man destilliert nun bis auf den zehnten Teil des Volumens ab, was aber nur bei zuckerfreien Harnen zulässig ist. Bei zuckerhaltigen Harnen muß man durch Zutropfenlassen von Wasser aus einem Scheidetrichter während der Destillation eine so starke Konzentration zu verhindern suchen, weil andernfalls aus dem Zucker jodoformbildende Substanzen entstehen können. Destillat und vorgelegtes Wasser des Kugelapparates werden zusammen mit wenig Calciumcarbonat tüchtig geschüttelt, dann wiederum abdestilliert. Das aufgesammelte Destillat wird durch Zusatz von 1 ccm achtfachverdünnter Schwefelsäure in der gleichen Weise nochmals der Destillation unterworfen. Das hierbei erhaltene Destillat bringt man in eine geräumige Glasstöpselflasche, fügt eine in einer Bürette abgemessene, aber überschüssige Menge 1/10 n-Jodlösung sowie nitritfreie Kalilauge im Ueberschusse hinzu, schüttelt 1 Minute lang kräftig durch und läßt weitere 5 Minuten lang ruhig stehen. Nun säuert man mit Salzsäure an und läßt aus einer Bürette so lange 1/10 n-Natriumthiosulfatlösung zufließen, bis das beim Ansäuern braun gewordene Gemisch nur noch schwach gelb gefärbt ist. Man setzt jetzt einige ccm wirksame Stärkelösung hinzu und weiterhin unter Umschütteln tropfenweise von der 1/10 n-Thiosulfatlösung bis zur Entfärbung.

Vereinfachte Destillation. Nach der obigen Vorschrift hat man dreimal zu destillieren. Die zweite Destillation unter Zusatz von Calciumcarbonat kann in den allermeisten Fällen unterbleiben, da die Harndestillate in der Regel höchstens Spuren von Ameisensäure[2]) und salpetriger Säure enthalten. Man verfährt demnach so, daß man 500 ccm normal sauren Harn nach Zusatz von 2 ccm 50% iger Essigsäure bis auf 100 ccm abdestilliert und das aufgesammelte Destillat

---

[1]) Der betreffende Harn muß sauer reagieren; ein alkalisch reagierender Harn muß erst durch Essigsäurezusatz auf die normale Acidität gebracht werden.

[2]) In der Tagesmenge Harn sollen etwa 0,05 g Ameisensäure enthalten sein.

nach Zusatz von 1 ccm achtfach verdünnter Schwefelsäure nochmals der Destillation unterwirft.

Berechnung. Nach den obigen Gleichungen entspricht 1 Atom Jod $^{1}/_{6}$ Mol. C_3H_6O = 9,67 Aceton. Somit zeigen 1000 ccm $^{1}/_{10}$ n-Jodlösung 0,967 g Aceton und 1 ccm $^{1}/_{10}$ n-Jod zeigt 0,967 mg Aceton an.

Man hat also die Differenz aus der in Kubikzentimetern abgemessenen Menge $^{1}/_{10}$ n-Jodlösung und der beim Zurücktitrieren verbrauchten Menge $^{1}/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung mit 0,967 zu multiplizieren, um die Menge Aceton in Milligrammen zu erfahren, welche in der untersuchten Harnmenge enthalten ist.

2. Die Bestimmung nach W. Albada van Eckenstein und J. J. Blanksma[1]).

Diese Methode der Bestimmung des Acetons beruht auf der leichten Bildung von Aceton-p-Nitrophenylhydrazon beim Zusammenbringen einer wässerigen Acetonlösung, wie eines acetonhaltigen Harndestillats, mit einer Lösung von p-Nitrophenylhydrazin in Eisessig:



$$(CH_3)_2C{:}O + H_2{:}N \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot NO_2(1,4) = H_2O + (CH_3)_2C{:}N.NH.C_6H_4 \cdot NO_2(1,4).$$

Ausführung im Harn nach einer von S. Möller[2]) gegebenen Vorschrift. Man destilliert 200 ccm Harn nach Zusatz von 5 ccm 33%iger Schwefelsäure und sammelt das Destillat in einer mit Eis gut gekühlten Vorlage, die noch mit einer Kugelvorlage, wie mit einer Péligotröhre in Verbindung steht. In die Kugelvorlage bringt man 20 ccm Wasser. Es werden 100 bis 120 ccm Destillat aufgefangen, das mit dem Inhalte der Kugelvorlage vereinigt und alsdann mit einer frisch bereiteten und filtrierten Lösung von 0,5 bis 1 g p-Nitrophenylhydrazin in 5—10 ccm Eisessig und der doppelten Menge Wasser versetzt wird. Alsbald beginnt eine hellgelbe, kristallinische Abscheidung von p-Nitrophenylhydrazon, die schon nach einer halben Stunde[3]) beendigt ist.

Diese Abscheidung wird auf einem gehärteten und gewogenen Filter gesammelt, gut abgesaugt und unterhalb 80°, am besten unter einer evakuierten Glasglocke über Schwefelsäure, bis zum konstanten Gewicht ausgetrocknet.

Berechnung. Dem Aceton-p-nitrophenylhydrazon, in welcher Form das Aceton zur Wägung gelangt, kommt die empirische Formel $C_9H_{11}O_2N_3$ (= 193) und dem Aceton die Formel C_3H_6O (= 58) zu. Auf Grund der Proportion $C_9H_{11}O_2N_3$ (193) : C_3H_6O (58) = gewogene Menge »Hydrazon« : x findet man die dem erhaltenen Aceton-p-nitrophenylhydrazon entsprechende Menge Aceton, wenn man das Gewicht des Niederschlags mit 0,3 multipliziert; 58 : 193 ist nämlich sehr angenähert 0,3. Wegen der, wenn auch nur geringen Löslichkeit des

[1]) Recueil d. trav. chim. des Pays-Bas 22, 434 (1903).

[2]) Centralblatt für klinische Medizin 64, 207 (1907).

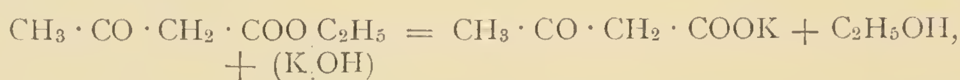
[3]) Ein längeres Stehenlassen ist wegen der Zersetzlichkeit des Reagenses nicht zulässig.

»Hydrazons« muß eine Korrektur angebracht, nämlich zu dem gefundenen Aceton für je 100 ccm Filtrat noch 0,0018 g Aceton zugezählt werden.

Bemerkungen. Das aus dem Harndestillat erhältliche Aceton-p-nitrophenylhydrazon ist meist kristallinisch und besteht aus einheitlichen Krystallnadeln; sein Schmelzpunkt liegt in der Regel bei 143—144° und erhöht sich nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol auf 146—147°.

Acetessigsäure.

Die freie Acetessigsäure $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH$ (Ketoform) oder $CH_3 \cdot C(OH) : CH \cdot COOH$ (Enolform) erhält man durch 24-stündiges Stehenlassen einer Lösung von Acetessigsäureäthylester mit wässeriger Kalilauge in der Kälte:



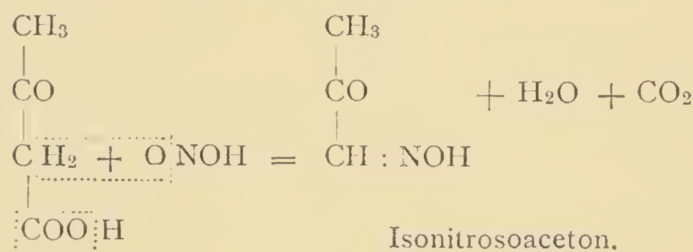
$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COO\,C_2H_5 + (K.OH) = CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOK + C_2H_5OH,$$

Zerlegen des gebildeten Kaliumsalzes mit Schwefelsäure und Ausschütteln mit Aether. Sie bildet eine dickliche, mit Wasser mischbare, stark sauer reagierende Flüssigkeit, die schon unter 100° in Aceton und Kohlendioxyd zerfällt:



$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot \boxed{COO}\,H = CO_2 + CH_3 \cdot CO \cdot CH_3.$$

Acetessigsäure reagiert mit salpetriger Säure sofort unter Bildung von Kohlendioxyd, Isonitrosoaceton und Wasser:



Die bis jetzt dargestellten Salze der Acetessigsäure sind in Wasser leicht löslich; in verdünnterer Lösung ist das Kaliumsalz haltbar, in konzentrierterer Lösung zersetzt es sich, bei gewöhnlicher Temperatur langsam, beim Kochen schnell, und zwar in Aceton und kohlensaures Salz. Eisenchlorid färbt die Lösungen der Acetessigsäure und ihrer Salze violettrot.

Für den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Acetessigsäure im Harn muß beachtet werden, daß die freie Säure und ihre Salze nicht lange haltbar sind. Man muß daher, wenn irgend möglich, den frisch gelassenen Harn für die chemische Untersuchung auf Acetessigsäure verwenden. In 24 bis 48 Stunden kann die Acetessigsäure aus einem Harne vollständig verschwunden sein.

Nachweis der Acetessigsäure im Harn.

1. Die Probe von Gerhardt beruht auf der Färbung von Acetessigsäure und ihrer Derivate durch Eisenchlorid. — Man versetzt 10 bis 20 ccm Harn zunächst solange tropfenweise mit Eisen-

chloridlösung (Liquor Ferri sesquichlorati), als noch ein weißlicher Niederschlag (Phosphat) entsteht, filtriert dann ab und fügt zum Filtrat eine weitere Menge Eisenchloridlösung. Dieses Filtrat färbt sich jetzt bordeauxrot, wenn der Harn Acetessigsäure enthält. In zweifelhaften Fällen führe man mit einem Harne, der bestimmt frei von Acetessigsäure ist, eine Gegenprobe aus. Die durch Acetessigsäure bedingte Färbung ist nicht lange haltbar; schon bei 2 Minuten langem Kochen verschwindet sie vollständig oder nahezu vollständig.

Die Gerhardt'sche Probe auf Acetessigsäure ist nicht ganz eindeutig, da verschiedene Substanzen, die, besonders nach Einnahme bestimmter Arzneimittel, im Harne auftreten können, mit Eisenchlorid ebenfalls rote oder violettrote Färbungen geben. Zu diesen Substanzen gehören Rhodanide, Salizylsäure und ihre Salze (violett), Aspirin, Antipyrin, Chinanisol. — Auch Phenol (Carbolsäure) gibt bekanntlich mit Eisenchlorid ebenfalls eine violette Färbung, kommt aber für den Harn nicht in Betracht, da es im Organismus in Phenolschwefelsäure und, falls größere Mengen Phenol einverleibt werden, auch in Phenolglukuronsäure übergeführt wird, die aber mit Eisenchlorid keine Färbung geben. — Was nun die Arzneimittel Antipyrin, Aspirin, Salizylsäure, betrifft, so scheint dem Verfasser die einfachste Lösung, die zu sein, daß man das betreffende störende Arzneimittel für 2 oder 3 Tage aussetzt, vorausgesetzt, daß das Befinden des betreffenden Kranken es gestattet, und dann den nach dieser Zwischenperiode gelassenen Harn mit den Gerhardt'schen Reagens auf Acetessigsäure prüft. Im Unterschiede zum Antipyrin- und Salizylsäureharn gibt der Acetessigsäureharn nach dem Kochen die Eisenchloridprobe nicht mehr.

G. O. Mayer führt die Probe als Schichtprobe aus, indem er den betreffenden Harn über einige Kubikzentimeter einer Mischung aus 5 ccm Eisenchloridlösung und 95 ccm einer Kochsalzlösung (1 : 3) schichtet.

2. Ausschüttelung der Acetessigsäure mit Aether. Freie Acetessigsäure geht aus wässeriger Lösung in Aether über. Man säuert 100 bis 200 ccm Harn mit verdünnter Schwefelsäure stark an, schüttelt in einem Scheidetrichter sofort mit Aether gut aus, trennt die klare Aetherlösung und schüttelt sie mit einer stark verdünnten wässerigen Eisenchloridlösung aus. Die letztere färbt sich dann violett und auf weiteren Zusatz von Eisenchlorid bordeauxrot. Die Färbung ist nicht sehr beständig. Enthält der Harn Rhodanwasserstoff, so ist nicht die wässerige, sondern die aetherische Lösung rot gefärbt.

3. Die Probe von Arnold-[1]) Lipliawsky.

Erfordernisse: 1) Lösung von salzsaurem p-Aminoacetophenon. 1 g p-Aminoacetophenon $CH_3 \cdot CO \cdot C_6H_4 \cdot NH_2$ wird in 100 ccm Wasser unter Zusatz von 2 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst. 2) Eine wässerige 1⁰/₀ige Kaliumnitritlösung.

[1]) Chemisches Centralblatt 1899, II. 146 — und ebenda 1900. II. 345.

Ausführung. Man mischt 6 ccm der salzsauren p-Aminoacetophenonlösung mit 3 ccm der Kaliumnitritlösung, fügt das gleiche Volumen, also 9 ccm Harn, sowie einen Tropfen konz. Ammoniak hinzu und schüttelt tüchtig durch; es tritt hierbei eine ziegelrote Färbung auf. Dieser Mischung entnimmt man, je nach dem vermuteten Gehalt des Harns an Acetessigsäure, 10 Tropfen bis 2 ccm, fügt 15 bis 20 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19), 3 ccm Chloroform sowie 2—4 Tropfen Eisenchloridlösung hinzu und bewegt das verschlossene Reagensglas vorsichtig hin und her, ohne es zu schütteln, so daß die beiden Flüssigkeitsschichten 1 Minute oder länger langsam durcheinanderlaufen. Enthält der Harn Acetessigsäure, so färbt sich das Chloroform violett. Ist diese Säure aber nicht zugegen, so nimmt das Chloroform eine gelbliche oder blaßrötliche Färbung an. Die durch die Acetessigsäure bedingte violette Farbe ist lichtbeständig und für längere Zeit haltbar. — Aceton, β-Oxybuttersäure, Traubenzucker, ferner Arzneimittel wie Salicylsäure, Aspirin, Antipyrin geben die Reaktion nicht und üben auf dieselbe auch keinen störenden Einfluß aus.

Die Bestimmung der Acetessigsäure und des Acetons.

1. Nach G. Embden und H. Schliep[1]).

Man bestimmt in einer Probe Harn das Gesamtaceton, d. h. das präformierte Aceton und das aus der Acetessigsäure bei der Destillation mit einer Säure hervorgehende Aceton nach Messinger. In einer zweiten Probe des Harns wird das präformierte Aceton durch Destillation im Vacuum bei möglichst niederer Temperatur ausgetrieben und im Destillationsrückstande, der jetzt nur Acetessigsäure enthält, ebenfalls eine Bestimmung ausgeführt. Zieht man den hierbei erhaltenen Acetonwert vom Gesamtaceton ab, so erfährt man die Menge an präformiertem Aceton. Die Bestimmung setzt also voraus, daß die Acetessigsäure unter diesen Bedingungen nicht in Aceton und Kohlendioxyd zerfällt, ferner daß die Acetessigsäure hierbei auch als solche nicht flüchtig ist.

Ausführung. Man bestimmt in 20 ccm frischem Harn das Gesamtaceton nach Messinger. Bei sehr hohem Acetongehalt nehme man nur 10 ccm Harn und andrerseits bei sehr niedrigem Gehalt an Aceton 50 ccm und mehr Harn.

Eine gleichgroße Harnmenge wie bei dem ersten Versuche bringt man in einen 2 Literrundkolben, fügt 130—150 ccm Wasser hinzu und destilliert bei möglichst niedrigem Drucke, bei 30—40 mm, aus einem Wasserbade bei einer Temperatur des Wassers, die 34 bis 35° nicht übersteigen soll, und unter Benutzung einer Kapillare 55—60 ccm über. Unter diesen Bedingungen ist alles präformierte Aceton übergegangen. Für diese Destillation sind in der Regel 30—35 Minuten erforderlich. Der Destillationsrückstand, der jetzt nur noch Acetessigsäure enthält, wird in

[1]) Centralbl. f. d. ges. Physiol. und Pathol. des Stoffw. N. F. 2, 250 und 289 (1907).

ein Destillationsgefäß übergeführt, dann das aus der Acetessigsäure hervorgehende Aceton bestimmt. — Zu dem Zwecke wird der Destillationsrückstand nach Geelmuyden (s. oben) mit Schwefelsäure angesäuert und alsdann destilliert.

Bei der Destillation im Vakuum werden geringe Mengen Acetessigsäure gespalten; infolgedessen wird für das präformierte Aceton ein etwas zu hoher Wert, Maximalwert, und für die Acetessigsäure ein zu kleiner Wert, Minimalwert, gefunden.

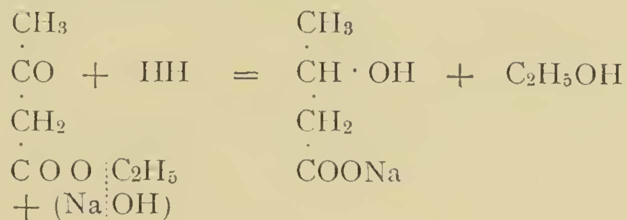
2. Nach O. Folin[1]) wird das präformierte Aceton durch einen lebhaften Luftstrom aus dem Harne ausgetrieben, in eine Mischung aus Kalilauge und $^1/_{10}$ n-Jodlösung eingeleitet und durch Zurückmessen der überschüssigen Jodlösung maßanalytisch bestimmt. Acetessigsäure bleibt hierbei unverändert und geht nicht in die Vorlage über.

Ausführung. Man versetzt 20 bis 25 ccm Harn mit einigen Tropfen 10%iger Phosphorsäure oder mit 0,2 bis 0,3 g Oxalsäure, mit 8 bis 10 g Natriumchlorid und etwas Petroleum. Der Kolben wird mit einer Vorlage verbunden, welche 4 g Aetzkali in 150 ccm Wasser gelöst und 30 bis 50 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung enthält. Mit Hilfe einer Saugpumpe wird nun ein lebhafter Luftstrom während 25 Minuten, ohne zu erwärmen, durch den Harn hindurchgesaugt. Dann wird der Inhalt der Vorlage mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und das hierbei frei gewordene, also nicht gebundene, überschüssige Jod mit $^1/_{10}$ n-Thiosulfatlösung titriert. Auf diese Weise erfährt man die Menge des präformierten Acetons. Bestimmt man dann in einer neuen, gleich großen Menge des Harns das Gesamtaceton, so gibt die Differenz beider Bestimmungen die Menge der Acetessigsäure an.

Man kann auch in der Weise arbeiten, daß man nach Entfernung der ersten Vorlage eine zweite Vorlage mit Kalilauge und einer abgemessenen Menge $^1/_{10}$ n-Jodlösung vorlegt, dann den Harn, der ja mit Phosphorsäure bereits angesäuert ist, zum Sieden erhitzt und nun das aus der Acetessigsäure hervorgehende Aceton ebenfalls durch einen Luftstrom übertreibt.

β-Oxybuttersäure.

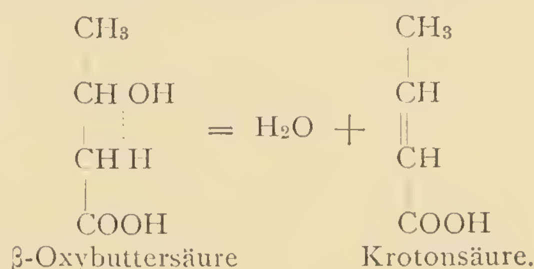
J. Wislicenus[2]) hat die i-β-Oxybuttersäure $CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot COOH$ durch Einwirkung von Natriumamalgam und Wasser, also von naszierendem Wasserstoff auf Acetessigester zuerst dargestellt; hierbei wird die Ketogruppe zur sekundären Alkoholgruppe reduziert und gleichzeitig die Estergruppe verseift:



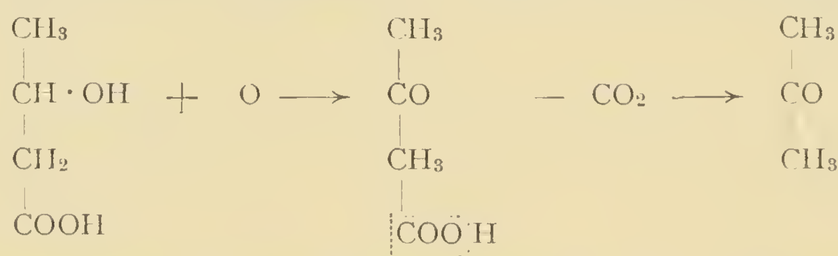
1) Journ. of Biol. Chem. 3, 177 (1907) und 4, 473 (1908).

2) Annal. d. Chem. und Pharm. 149, 205 (1869).

Durch Zersetzen des Natriumsalzes mit Schwefelsäure, Ausschütteln mit Aether und Verdampfen der ätherischen Lösung wurde die freie i-β-Oxybuttersäure als ein kaum gefärbter, zäher, hygroskopischer Syrup erhalten. Nach Magnus-Levy kristallisiert die optisch aktive, linksdrehende Säure in glashellen, plattenförmigen Kristallen, die bei langsamem Erwärmen bei 49—50° schmelzen. l-β-Oxybuttersäure ist in Wasser, Alkohol, Aceton sowie Aether leicht löslich. $[\alpha]_D^{17-22} = -24{,}12$ bei Konzentration unter 12%. (Magnus-Levy.) Sie ist eine ziemlich starke einbasische Säure, deren Salze in Wasser leicht löslich und auch in absolutem Alkohol löslich sind; sie zeigen ebenfalls Linksdrehung. Im Unterschiede zur Acetessigsäure färben sich die Lösungen der β-Oxybuttersäure und ihrer Salze mit Eisenchlorid nicht rot. β-Oxybuttersaure Salze werden durch neutrales Bleiacetat, Bleiessig oder Bleiessig und Ammoniak nicht gefällt. Beim Erhitzen der Säure mit mäßig verdünnter Schwefelsäure wird sie in Wasser und Krotonsäure gespalten, welche überdestilliert; auch schon beim Kochen der wässerigen Lösung der β-Oxybuttersäure tritt der gleiche Zufall ein:



Mit Chromsäuregemisch oxydiert, liefert die β-Oxybuttersäure Aceton; als intermediäres Oxydationsprodukt dürfte hierbei Acetessigsäure auftreten, die dann weiter in Aceton und Kohlendioxyd zerfällt:



Durch Oxydation des Ammoniumsalzes der β-Oxybuttersäure mit Wasserstoffsuperoxyd entstehen Acetessigsäure, Aceton, Acetaldehyd, Essigsäure, Ameisensäure, CO_2 und H_2O (H. D. Dakin[1]). A. Mac Kenzie[2]) hat die inaktive β-Oxybuttersäure durch systematische Kristallisation ihres Chininsalzes in wässeriger Lösung in ihre optisch aktiven Komponenten zerlegt und das l-Säure-Chininsalz zuerst isoliert; die aus dem Chininsalz erhaltene l-β-Oxybuttersäure zeigte $[\alpha]_D^{16} = -24{,}9^0$, ihr Natriumsalz $[\alpha]_D^{15} = -14{,}5^0$, also Werte, welche mit den Werten, die Magnus-Levy für die aus Diabetikerharn erhaltene l-Säure gefunden hat, gut übereinstimmen. — Die inaktive β-Oxybuttersäure wird auch im lebenden Organismus gespalten; zum Teil tritt

[1]) Journ. of Biol. Chem. 4, 91 (1908).

[2]) Proceedings Chem. Soc. 17, 213 (1901) und Journ Chem. Soc. 81, 1402 (1902).

freilich eine Umwandlung in Acetessigsäure und Aceton ein; ein kleiner Teil der Säure bleibt aber unangegriffen, und dieser erwies sich als linksdrehend. Es scheint daher, daß die rechtsdrehende Säure im Körper leichter zersetzt wird wie die l-Säure.

Darstellung der β-Oxybuttersäure aus Zuckerharn.

1. Nach E. Külz [1]). Man läßt eine größere Menge des Zuckerharns bei 20 bis 30° mit Hefe vergähren, dampft alsdann auf dem Wasserbade zum dünnen Syrup ein, neutralisiert mit Natriumkarbonat oder Natronlauge und dampft noch weiter ein. Den dicken Rückstand verrührt man mit dem dreifachen Volumen 95%igem Alkohol, filtriert ab, destilliert aus dem Filtrat den Alkohol ab, versetzt den Rückstand wiederum mit Alkohol und wiederholt diese Fällung mit Alkohol und Destillation des Auszugs so oft, bis ein Rückstand erhalten wird, der mit absolutem Alkohol keinen Niederschlag mehr gibt. Von der zuletzt erhaltenen, absolut alkoholischen Lösung wird der Alkohol abdestilliert, der Rückstand zur Entfernung von noch anhaftendem Alkohol dreimal mit dem gleichen Volumen Aether ausgeschüttelt, dann wird der Rückstand mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether bis zur Erschöpfung ausgezogen, d. h. so oft mit größeren Mengen Aether ausgeschüttelt, bis sich in dem Auszuge keine Linksdrehung mehr nachweisen läßt. Die nach dem Abdestillieren des Aethers aus den Auszügen zurückbleibende Flüssigkeit wird mit basischem Bleiacetat vorsichtig ausgefällt (β-Oxybuttersäure wird nicht gefällt), das Filtrat mit Schwefelwasserstoff von Blei befreit, wiederum filtriert und, zur Entfernung von anhaftender Essigsäure, nach starkem Verdünnen mit Wasser, wiederum abgedampft. Die zurückbleibende Säure wird mit Baryumkarbonat in das Baryumsalz und dieses mit einer konzentrierten ammoniakalischen Lösung von schwefelsaurem Silber in das Silbersalz übergeführt, welches nach dem Umkristallisieren aus Wasser durch Salzsäure oder Schwefelwasserstoff zerlegt wird. Das Filtrat hinterläßt dann beim Eindampfen die β-Oxybuttersäure als farblosen Syrup.

2. Nach Magnus-Levy [2]). 500 ccm des unvergohrenen Harns werden mit 25—30 g Ammoniumsulfat versetzt, dann auf etwa 100 ccm eingeengt, mit zirka 40 ccm mit Ammoniumsulfat gesättigter verdünnter Schwefelsäure angesäuert und in einem geeigneten Aetherextraktionsapparate mit Aether erschöpft oder im Schüttelapparat 12 bis 18 Mal mit größeren Mengen Aether ausgeschüttelt. Die abgetrennte Aetherlösung wird zur Entfernung von anorganischen Säuren und anderen Verunreinigungen mit ganz wenig Wasser geschüttelt, dann durch ein trockenes Filter gegossen und das Filtrat, falls es nicht zu groß ist in einer Schale eingedunstet. Bei größeren Mengen wird der Aether aus der Aetherlösung abdestilliert. Der Aetherrückstand bildet einen Syrup, der neben β-Oxybuttersäure flüchtige Fettsäuren und Hippursäure enthält; er wird mit ca. 10—20 ccm kaltem Wasser versetzt, wobei die Hippursäure sich ausscheidet. Aus dem Filtrate von der Hippursäure werden die Fettsäuren abdestilliert, dann wird der Rückstand mit Tierkohle gekocht, abfiltriert, und zum Syrup eingeengt. Manchmal gelingt es, diesen Syrup durch Einimpfen von kristallisierter β-Oxybuttersäure zur Kristallisation zu bringen. Gelingt dies nicht, so neutralisiert man die wässerige Lösung der Säure mit Natronlauge, entfärbt möglichst mit Tierkohle, dampft ein, entwässert den Rückstand mit Alkohol und kristallisiert ihn aus absolutem Alkohol unter Zusatz von Aether um. Zweckmäßig kristallisiert man das so erhaltene Na-

[1]) Zeitschr. f. Biologie 23, 329 (1887).

[2]) Ergebnisse der innern Medizin und Kinderheilkunde 1, 5, 416 (1908) sowie Archiv f. experim. Pathol. und Pharmak. 45, 389 (1901).

triumsalz wiederholt aus absolutem Alkohol + Aether um. Aus der konzentrierten wässerigen Lösung des Natriumsalzes kann man durch Versetzen mit Schwefelsäure und Ausschütteln mit Aether die freie β-Oxybuttersäure gewinnen. Die Säure wird aus der wässerigen oder aetherischen Lösung in der Regel als Syrup erhalten, der aber durch Reiben mit einem Glasstabe häufig zur Kristallisation gebracht werden kann. Die Kristalle werden durch Aufstreichen auf Tonplatten und Liegenlassen dieser im Exsikkator von noch anhaftender Mutterlauge befreit, dann aus Wasser oder Aether unter Einimpfen bereits erhaltener Kristalle so oft umkristallisiert, bis sie bei 49—50° schmelzen.

Nachweis der β-Oxybuttersäure im Harn.

Man prüft den fraglichen Harn zunächst mit Hilfe der Gerhardtschen Eisenchloridprobe auf Acetessigsäure. Läßt sich diese Säure nicht nachweisen, so ist auch keine β-Oxybuttersäure vorhanden. Gibt aber ein Harn die Gerhardt'sche Probe, so kann der Harn neben Acetessigsäure auch β-Oxybuttersäure enthalten. Man läßt dann den Harn, falls er zuckerhaltig ist, mit Hefe vergähren, fällt mit Bleiacetat und Ammoniak aus und untersucht das Filtrat polariskopisch. Zeigt es eine deutliche Linksdrehung, so ist höchstwahrscheinlich β-Oxybuttersäure vorhanden, und zwar besonders dann, wenn gepaarte Glukuronsäuren von vornherein ausgeschlossen sind. Zum sicheren Nachweise der β-Oxybuttersäure führt man die folgenden Reaktionen aus.

1. Probe von Külz. Man läßt 200—300 ccm des zuckerhaltigen Harns mit Hefe vollständig vergären, dampft dann zum Syrup ein, destilliert nach Zusatz des gleichen Volumens konzentrierter Schwefelsäure ohne Kühlung und fängt das Destillat in einem weiteren Reagensglase auf, das man nach beendeter Destillation einige Zeit in Eis stehen läßt. Hat der Harn β-Oxybuttersäure enthalten, so scheidet sich jetzt aus dem Destillate Krotonsäure aus, die nach dem Abfiltrieren und Trocknen über Schwefelsäure, zweckmäßig im Vacuum, durch ihren Schmelzpunkt von 71—72° als solche erkannt wird. Bilden sich keine Kristalle von Krotonsäure, so schüttelt man das Destillat mit Aether aus, läßt die Aetherlösung eindunsten und bestimmt vom ausgetrockneten Rückstande den Schmelzpunkt. Verunreinigungen wie Parakresol, Benzoësäure, Salicylsäure lassen sich nur durch Auswaschen mit kaltem Wasser beseitigen. Auch das von Embden und Schmitz angegebene Reinigungsverfahren leistet in vielen Fällen gute Dienste; nach diesem wird die rohe Krotonsäure in Aether gelöst und die ätherische Lösung auf ein kleineres Volumen eingedunstet; fügt man jetzt kalten Petroläther hinzu, so scheidet sich die Krotonsäure aus, während beigemengte flüchtige Fettsäuren sowie Benzoësäure gelöst bleiben.

2. Probe von Black[1]). Ueberführung in Acetessigsäure. Man dampft 20 ccm Harn auf dem Wasserbade, also bei gelinder Wärme, auf zirka 5 ccm ein, wodurch die im Harne vorhandene Acetessigsäure entfernt wird, säuert dann mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure

[1]) The Journ. of Biolog. Chem. 5, 207 (1908/09).

an, verreibt mit soviel gebranntem Gyps, daß eine dicke Masse entsteht, und überläßt diese sich selbst bis zur beginnenden Erstarrung. Die Masse wird dann zerstoßen, 2—3 Mal mit Aether gründlich ausgezogen, die abfiltrierte Aetherlösung eingedunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Baryumkarbonat neutralisiert. Man versetzt nun das neutrale Filtrat erst mit 2—3 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (von 3% H_2O_2), dann mit einigen Tropfen 5%iger Eisenchloridlösung, die eine Spur Ferrosalz enthält. Nach wenigen Sekunden tritt eine Rosafärbung ein, die allmählich stärker wird, um später zu verblassen. Ueberschüssiges Eisenchlorid und Wasserstoffsuperoxyd sind zu vermeiden.

3. Probe von Hart. Nach dieser Probe wird die β-Oxybuttersäure nach dem Wegkochen von Aceton und Acetessigsäure, falls diese vorhanden sind, zu Aceton oxydiert und dieses dann nachgewiesen.

Man verdünnt 20 ccm Harn mit dem gleichen Volumen Wasser, versetzt mit einigen Tropfen Essigsäure und dampft auf 10 ccm ein. Nun wird wieder mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt, 1 ccm 3%iges Wasserstoffsuperoxyd zugegeben, gelinde erwärmt und abgekühlt. Dann fügt man 1 ccm Eisessig und einige Tropfen frisch bereiteter Nitroprussidnatriumlösung hinzu und überschichtet schließlich mit Ammoniak. Ist β-Oxybuttersäure im Harn vorhanden, so findet man an der Berührungsstelle nach 4—5 Stunden einen purpurroten Ring. Beim Schütteln verbreitet sich die Färbung durch die ganze Flüssigkeit. 0,3% β-Oxybuttersäure lassen sich mittelst dieser Probe noch sicher nachweisen.

4. Darstellung des Silbersalzes nach Minkowski. Man läßt eine größere Menge des betreffenden Harns mit Hefe vergähren, verdampft auf dem Wasserbade, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, verdunstet den filtrierten Alkoholauszug, säuert den hierbei bleibenden Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure an, filtriert und schüttelt die β-Oxybuttersäure mit Aether aus. Den Rückstand dieses ätherischen Auszuges löst man in Wasser, filtriert, entfärbt möglichst vollständig mit Tierkohle, neutralisiert genau mit Natronlauge und dampft zum dicken Syrup ein, den man mit einigen Tropfen konzentrierter Silbernitratlösung versetzt. Bei Vorhandensein von β-Oxybuttersäure erstarrt der Syrup zu einem Kristallbrei von haarfeinen, verfilzten Nadeln des Silbersalzes. Von diesem Silbersalze kann nach dem Umkristallisieren aus wenig warmem Wasser das Drehungsvermögen und sein Silbergehalt bestimmt werden. β-Oxybuttersaures Silber hat vakuumtrocken die Zusammensetzung $C_4H_7O_3Ag$, kristallisiert in sehr feinen Nadeln und ist linksdrehend; $[\alpha]_D = -10{,}1^0$ in 4%iger Lösung (Minkowski), — $8{,}46^0$ in 1,4%iger Lösung (Külz).

Quantitative Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Harne.

1. Das Verfahren von P. Bergell[1]). Durch Anwendung von

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 310 (1901).

geeigneten Trockenmitteln, nämlich von geglühtem Kupfersulfat und von feinkörnigem Sand, läßt sich nach diesem Verfahren die Extraktion des zum Syrup eingedampften und mit Phosphorsäure angesäuerten Harns im Soxhletschen Apparat durchführen, Bedingungen, unter welchen die β-Oxybuttersäure nahezu quantitativ in den Aether übergeht.

Ausführung. 100—300 ccm Harn werden mit Natriumkarbonat bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, dann auf dem Wasserbade zum Syrup eingedampft. Dieser wird nach dem Erkalten zunächst mit einem Phosphorsäuresyrup bis zur stark sauren Reaktion, dann mit 20—30 g fein gepulvertem, geglühtem Kupfersulfat und 20—25 g sehr fein körnigem Sand verrieben, wodurch ein trockenes Pulver erhalten wird. Dieses wird ohne Verlust auf ein Soxhletfilter gebracht und mit trockenem absolutem Aether, der ebenfalls durch geglühtes Kupfersulfat vorher getrocknet wird, im Soxhletapparat vollständig erschöpft, was bereits nach 1 Stunde erreicht ist. Darauf wird abfiltriert, das Kupfersulfat mit trockenem Aether ausgewaschen, der Aether abdestilliert, der Rückstand mit 20 ccm Wasser aufgenommen, mit sehr wenig Tierkohle entfärbt und die Linksdrehung der Lösung bestimmt. Zu Grunde gelegt wird die von Magnus-Levy angegebene spez. Drehung der β-Oxybuttersäure von $[\alpha]_D = -24{,}12^0$.

Bemerkungen. Nach dieser verhältnismäßig einfachen Bestimmungsmethode hat Bergell bestimmte, normalen Harne zugesetzte Mengen von β-Oxybuttersäure innerhalb der Fehler der Polarisationsmethode vollständig wiedergefunden. Ebenso wurde die zugefügte β-Oxybuttersäuremenge in einem Harne wiedergefunden, der nach Zusatz von 5% Traubenzucker vergohren war. Das gleiche Resultat wurde erhalten, als man normalem Harne 5% Traubenzucker zufügte und den Zucker nicht vergähren ließ.

2. Das Verfahren von A. Magnus-Levy[1]). Je nach der vermuteten Menge an β-Oxybuttersäure werden 100—1000 ccm des frischen Harns verarbeitet, auf je 100 ccm Harn werden 30—40 g Ammoniumsulfat und 10 bis 15 ccm Schwefelsäure (20% H_2SO_4) zugesetzt, sofort in den Aetherextraktionsapparat[2]) gebracht und mit Aether ausgezogen. Nach 24 und nach 48 Stunden gießt man den Aether aus dem Kölbchen durch ein trockenes Filter[3]) in ein Becherglas und überläßt ihn der freiwilligen Verdunstung. Der aus einem, Hippursäurekristalle enthaltenden Syrup bestehende Rückstand wird mit 8 bis 10 ccm Wasser versetzt. Eine auftretende Trübung oder ölige Fällung setzt sich innerhalb 12 bis 24 Stunden zum Teil kristallinisch ab. Nun wird in einen kleinen Meßzylinder abgegossen, mit möglichst wenig Wasser ohne Verlust nachgespült und auf 10 oder 20 ccm genau aufgefüllt. Nun wird zur

[1]) Ergebnisse der inn. Medizin und Kinderheilk. 1, 416 (1908).

[2]) Für größere Harnmengen, 300 ccm und mehr, empfiehlt Magnus-Levy den Apparat von Czelmannowitz

[3]) Befindet sich unter dem Aether eine braune Schmiere, so löst man diese, nach Abgießen des Aethers in wenig Wasser und bringt sie in den Extraktionsapparat zum Harn zurück.

Klärung eine kleine Messerspitze voll Kieselguhr zugegeben und durch ein dichtes Filter so oft filtriert, also immer wieder zurückgegossen, bis ein vollkommen klares Filtrat erhalten wird, das zur Polarisation benutzt wird.

Bemerkungen. Wenn der Aetherauszug der zweiten Portion nur noch einen geringen Rückstand hinterläßt und keine wesentliche Linksdrehung mehr zeigt, ist die Extraktion der β-Oxybuttersäure zu Ende geführt. Andernfalls muß eine dritte, unter Umständen sogar eine vierte 24stündige Extraktion mit Aether angeschlossen werden. Sollte die Lösung der β-Oxybuttersäure, die polarisiert werden soll, gefärbt sein, so schüttelt man sie mit einigen Körnchen basischem Bleikarbonat, leitet Schwefelwasserstoff ein und filtriert ab.

Traubenzucker.

Traubenzucker oder d-Glukose, auch Dextrose, Stärkezucker, Harnzucker genannt, $C_6H_{12}O_6 + H_2O$, findet sich bei Menschen und bei Tieren in geringer Menge stets im Blute vor, und zwar im Menschenblute im Mittel zu 1 ‰; ferner ist Traubenzucker in der Lymphe und in Spuren auch in anderen tierischen Flüssigkeiten und in Geweben, sowie im Darmkanale zur Zeit der Verdauung, vorhanden.

Ob der Harn der gesunden Menschen, also normaler Harn, Glukose enthält oder nicht, war lange Zeit eine strittige Frage, die aber jetzt endgültig entschieden sein dürfte. Die Ergebnisse sorgfältig ausgeführter chemischer Untersuchungen sprechen durchaus zugunsten der Auffassung, daß im normalen Harn wenigstens Spuren von Traubenzucker vorkommen können und meist auch vorkommen. Eine Stütze findet diese Annahme in der Tatsache, daß d-Glukose nach sehr reichlichem Genusse von Traubenzucker oder anderen Zuckerarten, welche durch den Verdauungsprozeß in Traubenzucker übergeführt werden, im Harn des gesunden Menschen vorübergehend auftreten kann. Wenn nämlich der Zuckergehalt des Blutes auf über 3 ‰ steigt, so kann Zucker in den Harn übergehen, denn es ist die Fähigkeit des tierischen Organismus, Traubenzucker zu assimilieren, selbstverständlich keine unbegrenzte. Wenn auf einmal eine so überaus große Menge Zucker in den Darmkanal eingeführt wird, daß die Assimilationsgrenze für Zucker überschritten wird, so geht der im Ueberschusse resorbierte Zucker in den Harn über: physiologische alimentäre Glukosurie. Diese dürfte in vielen Fällen also darauf zurückzuführen sein, daß auf einmal mehr Zucker in das Blut hineingelangt, als die Leber und die anderen Organe bewältigen können, daß also die Leber nicht imstande ist, den sämtlichen, ihr zugeführten Zucker in Glykogen umzuwandeln. Die mehr oder weniger große Leichtigkeit, mit welcher die Glykosurie eintritt, ist von individuellen Verhältnissen abhängig, denn es soll Personen geben, welche schon nach Aufnahme von 50 g Zucker d-Glukose im Harn ausscheiden, während bei anderen Personen die Glykosurie selbst nach Einnahme von 300 g Zucker ausbleiben kann. Bei anstrengender Muskelarbeit oder sonst erhöhter Wärmeabgabe

soll die Ausnutzung des Nahrungszuckers besser sein.

Unter gewissen krankhaften Verhältnissen kann eine auftretende alimentäre Glykosurie darauf zurückzuführen sein, daß die Assimilationsgrenze der betreffenden Person für Zucker stark herabgesetzt ist, so daß schon bei einer mäßigen, von einem gesunden Menschen leicht zu bewältigenden Zucker-, überhaupt Kohlehydrat-Zufuhr, Traubenzucker im Harne auftritt. Dies ist unter anderem auch der Fall bei gewissen chronischen Vergiftungen. — Nach Ansicht verschiedener Forscher soll zu dieser Art von Glykosurie auch die leichtere Form von Diabetes zu rechnen sein, bei welcher der Traubenzucker, nach möglichster Ausschaltung der Kohlehydrate aus der Nahrung, aus dem Harne vollständig, oder wohl richtiger gesagt, nahezu vollständig verschwindet.

Eine Hyperglykämie des Blutes, die zur Glykosurie führt, kann aber nicht nur auf die Weise zustande kommen, daß dem Körper von außen mit der Nahrung mehr Zucker zugeführt wird, als er bewältigen kann, sondern selbstverständlich auch dadurch, daß innerhalb des Organismus eine übermäßig große oder plötzlich gesteigerte Zuckerbildung aus Glykogen oder anderen Stoffen erfolgt. Zu dieser Gruppe rechnet man die Glykosurien nach Verletzung gewisser Nerven — Zuckerstich von Cl. Bernard — und nach Vergiftungen mit Kohlenoxyd, Aether, Amylnitrit, Chloroform, Curare, Morphin, Piperidin, Strychnin; auch die Adrenalinglykosurie dürfte hierher gehören. Nicht immer, wenigstens nicht ausschließlich, soll diese Art von Glykosurien mit einer gesteigerten Zuckerbildung aus Glykogen, sondern mit einer ungenügenden Sauerstoffzufuhr zusammenhängen. Wenigstens haben verschiedene Forscher gefunden, daß die durch Curare oder Piperidin hervorgerufene Glykosurie durch reichliche Sauerstoffzufuhr verhindert werden kann.

Wie oben gezeigt wurde, enthält das Blut durchschnittlich 1 ‰ Traubenzucker, während im Harn unter normalen Verhältnissen höchstens Spuren von Zucker vorkommen. Die Niere muß also bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit haben, zu verhindern, daß Glukose aus dem Blute in den Harn übergeht. Aus dieser Betrachtung folgt, daß die Zuckerausscheidung durch den Harn nicht nur mit einem abnorm hohen Zuckergehalt des Blutes (Hyperglykämie) zusammenzuhängen braucht, sondern daß sie ihre Ursache auch darin haben kann, daß die Fähigkeit der Niere, den Uebergang des Blutzuckers in den Harn zu verhindern, herabgesetzt oder gar ganz aufgehoben ist. Auf diese Unfähigkeit der Niere, den Zucker zurückzuhalten, soll der sogenannte Phloridzindiabetes zurückzuführen sein (v. Mering, Minkowski). v. Mering hat zuerst gefunden, daß bei Menschen und Tieren nach Verabreichung des Glukosides Phloridzin[1]) eine starke Glykosurie auftritt. Wie ge-

[1]) Phloridzin $C_{21}H_{24}O_{10} + 2H_2O$ findet sich in der Wurzelrinde des Apfel-, Kirschen- und Pflaumenbaumes, kristallisiert in seidenglänzenden, feinen Nadeln, schmilzt unter Wasserverlust bei 108—109°, wird dann fest und schmilzt, wasserfrei bei 158—160° (Stas), bei 170—171° (Schiff); es ist löslich in Alkohol,

naue quantitative Bestimmungen ergeben haben, kann der hierbei mit dem Harne zur Ausscheidung gelangende Traubenzucker nicht ausschließlich aus dem Glukoside selbst stammen, sondern er muß, wenigstens zum Teil, im Tierkörper selbst aus anderem Material gebildet werden. Nach Minkowski soll beim Phloridzindiabetes der Zuckergehalt des Blutes nicht vermehrt sein; nach diesem Forscher bewirkt das Phloridzin eine erhöhte Durchlässigkeit der Nieren für den Zucker.

Es dürfte kaum ein Zweifel darüber bestehen, daß eine Glykosurie also auch dadurch zustande kommen kann, daß die Fähigkeit des Körpers, den Traubenzucker zu verbrennen, also zu oxydieren, oder in irgend einer Weise zu verwerten, z. B. in Glykogen umzusetzen, mehr oder weniger stark herabgesetzt ist. Auf solch krankhafte Veränderungen im Organismus führt man die Zuckerharnruhr (Diabetes mellitus) zurück. Aus dem mangelhaften Verbrennungsvermögen für Traubenzucker darf aber nicht etwa geschlossen werden, daß alle übrigen Oxydationsprozesse beim Diabetiker darnieder liegen. Verschiedene Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, haben gefunden, daß Stoffe, welche nach ihrer Aldehydnatur dem Traubenzucker nahe stehen, oder die sogar als Abbau- oder Oxydationsprodukte dieses Zuckers aufgefaßt werden können, wie Glukuronsäure $COOH\,(CHOH)_4\,CHO$, d-Glukonsäure $CH_2OH\,(CHOH)_4\,COOH$, d-Zuckersäure, Schleimsäure $COOH\,(CHOH)_4\,COOH$, Glukosamin $CH_2OH\,(CHOH)_4\,CHO$, im Organismus des Diabetikers in der gleichen Weise und in demselben Maße oxydiert werden wie in demjenigen des gesunden Menschen.

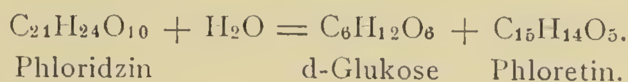
Die Armut an Glykogen in den Organen und Geweben des Diabetikers spricht zugunsten der Annahme, daß vielleicht nicht die mangelhafte Verbrennung der Glukose, sondern vielmehr die Unfähigkeit des Körpers, die d-Glukose in Glykogen zu verwandeln oder sonstwie zu verwerten, das Wesentlichste des Diabetes ist.

Es besteht allem Anscheine nach eine gewisse Beziehung zwischen Diabetes und dem Pankreas, indem bei verschiedenen Tieren, insbesondere beim Hunde, durch vollständige oder nahezu vollständige Exstirpation des Pankreas, ein echter Diabetes der schwersten Art — Pankreasdiabetes — hervorgerufen werden kann (Minkowski, v. Mering). Wie beim Menschen in den schwersten Formen des Diabetes, so erfolgt auch bei Hunden mit Pankreasdiabetes noch eine reichliche Zuckerausscheidung, wenn Kohlehydrate aus der Nahrung vollständig ausgeschlossen werden.

Herkunft des Traubenzuckers beim Diabetes. Es liegt die Frage sehr nahe, aus welchem Material der beim Diabetes mit dem

---

fast unlöslich in Aether. Als Glukosid wird Phloridzin durch Mineralsäuren hydrolytisch gespalten; durch Kochen mit verdünnten Säuren zerfällt es in d-Glukose und Phloretin:



$$C_{21}H_{24}O_{10} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_{15}H_{14}O_5.$$

Phloridzin d-Glukose Phloretin.

Harne ausgeschiedene Traubenzucker stamme? Bei dieser Krankheit werden 300 g Traubenzucker und mehr mit dem in 24 Stunden abgesonderten Harne ausgeschieden. Ein solcher Harn kann 4, 5, 8 und mehr Prozent Traubenzucker enthalten. Solch große Zuckermengen von 300 g $C_6H_{12}O_6$ können unmöglich ausschließlich von den Kohlehydraten der Nahrung oder dem Kohlehydratvorrate des Körpers herrühren. Dem Organismus des Diabetikers muß also die Fähigkeit zukommen, Traubenzucker aus anderem Material als aus Kohlehydraten zu erzeugen. Durch Versuche von Lüthje[1]) und von Pflüger[2]) ist die Fähigkeit des Tierkörpers, Traubenzucker aus nicht kohlehydrathaltigem Material zu erzeugen, bestimmt bewiesen. Lüthje hat seine Versuche an pankreasdiabetischen Hunden angestellt; hierbei haben die Versuchstiere bei kohlehydratfreier Eiweißnahrung solch große Zuckermengen ausgeschieden, daß diese unmöglich aus dem Vorrate des Körpers an Glykogen oder anderen kohlehydrathaltigen Substanzen hergeleitet werden konnten. Anders verhält es sich mit der Frage, ob dieser Zucker aus Eiweiß oder Fett oder aus beiden gebildet wird? Diese Frage läßt sich zur Zeit nicht einwandsfrei beantworten. Vom theoretischen Standpunkte aus betrachtet, steht der Annahme nichts im Wege, daß der Tierkörper d-Glukose sowohl aus Eiweiß als aus Fett zu bilden vermag. Die erwähnten Versuche von Lüthje an einem pankreasdiabetischem Hunde sprechen durchaus zugunsten einer Zuckerbildung aus Eiweiß. Bei 19tägigem Hungern schied das Versuchstier mit dem Harne unter den 6 letzten Hungertagen als Mittel täglich 10,4 g Zucker aus. Durch ausschließliche Eiweißnahrung konnte dann eine Zuckerausscheidung von 97,5 g Traubenzucker pro Tag herbeigeführt werden.

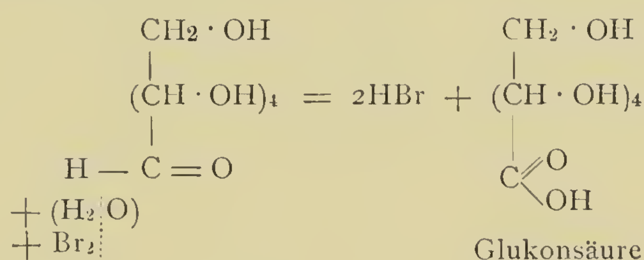
Eigenschaften. Traubenzucker kristallisiert mit 1 Mol. Wasser in warzenförmigen, kristallinischen, aus mikroskopischen, sechsseitigen Tafeln bestehenden Massen; aus absolutem Alkohol wird er in kristallwasserfreien, mikroskopischen Nadeln erhalten. Der kristallwasserhaltige Traubenzucker schmilzt schon gegen 100°, wird bei 110° wasserfrei und schmilzt dann erst wieder bei 146—147°. Oberhalb 174° verliert er innermolekular Wasser, geht erst in das Anhydrid Glukosan $C_6H_{10}O_5$ und bei stärkerem Erhitzen in braun gefärbten Caramel über. In Wasser ist Traubenzucker sehr leicht, in Alkohol ziemlich leicht löslich. 100 Tle. Wasser lösen bei 17,5° 81,7 Tle. wasserfreien Traubenzucker und 100 Tle. Alkohol vom sp. Gew. 0,837 lösen bei derselben Temperatur 1,94, in der Siedehitze 21,7 Tle. des wasserfreien Zuckers. In Methylalkohol ist er langsam, aber reichlich löslich, in Aether und in Aceton jedoch unlöslich. — Aus kochsalzhaltigen Traubenzuckerlösungen scheiden sich bei gewissen Konzentrationen und längerem Stehen große sechsseitige Doppelpyramiden oder Rhomboëder von der Zusammensetzung [$2C_6H_{12}O_6$ +

[1]) Pflügers Archiv 106.
[2]) ebenda 108.

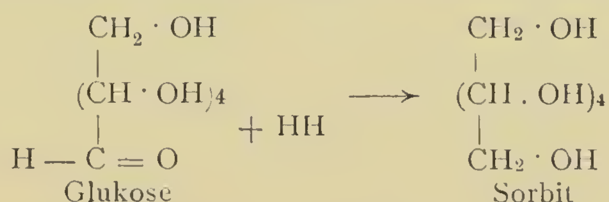
$NaCl + H_2O$] aus. — Die Lösungen des Traubenzuckers drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts; für die wasserfreie d-Glukose in wässeriger Lösung beträgt die spez. Drehung $[\alpha]D = + 52{,}50^0$.

Eine in der Kälte frisch bereitete wässerige Lösung besitzt eine nahezu doppelt so starke Rechtsdrehung als eine Lösung von der gleichen Konzentration, die aber längere Zeit gestanden hat. Der Traubenzucker zeigt also Birotation, die beim gelinden Erwärmen der Lösung in ungefähr $^1/_4$ Stunde, in der Kälte aber erst in etwa 24 Stunden auf die normale Drehung zurückgeht.

Traubenzucker wird als Aldehyd leicht oxydiert und wirkt daher auf viele Substanzen reduzierend. So werden Gold-, Platin-, Silber-, alkalische Quecksilber-, Kupfer- und Wismut-Lösungen durch Traubenzucker, besonders beim Erwärmen, reduziert. — Durch Oxydation mit Chlor (Hlasiwetz, Habermann[1]) oder Brom (Kiliani[2]) bei Gegenwart von Wasser entsteht aus dem Aldehyd Traubenzucker die einbasische Glukonsäure:



Auch beim Kochen von Traubenzucker mit Kupferhydroxyd und wenig Aetzbaryt, sowie mit gelbem Quecksilberoxyd (Heffter[3]) entsteht Glukonsäure, in letzterem Falle unter Abscheidung von Quecksilber. Beim Erwärmen von Traubenzucker mit Wasser und Silberoxyd im Wasserbade tritt unter starker Silberreduktion lebhafte Kohlensäureentwicklung ein; in der abfiltrierten Flüssigkeit läßt sich dann reichlich Glykolsäure $CH_2(OH) . COOH$ nachweisen. Auch hierbei dürfte zuerst Glukonsäure entstehen, welche dann zu Glykolsäure und Kohlensäure weiter oxydiert wird (Kiliani, l. c.). Auch der Pilz Bacterium aceti oxydiert die Glukose zu Glukonsäure. Konzentrierte Salpetersäure oxydiert Traubenzucker zu Zuckersäure $COOH(CHOH)_4 COOH$ und Oxalsäure. — Natriumamalgam reduziert Traubenzucker in wässeriger Lösung zum entsprechenden sechswertigen Alkohol, dem Sorbit:



Verhalten gegen verdünnte Säuren. In sauren Lösungen ist der Traubenzucker beständiger als in alkalischen; beim Eindampfen der

---

[1]) Annalen der Chemie 155, 121 (1870).

[2]) Annalen der Chemie 205, 182 (1880).

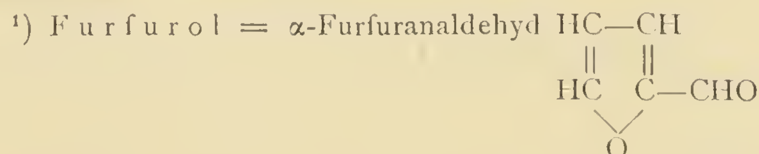
[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 22, 1049 (1889).

mit Essigsäure oder wenig Salzsäure angesäuerten Traubenzuckerlösungen tritt eine bemerkenswertere Zersetzung des Zuckers nicht ein. Beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren liefert Traubenzucker wie auch Rohr- und Fruchtzucker, Huminsubstanzen, Ameisensäure HCOOH, Laevulinsäure $CH_3 . CO . CH_2 . CH_2 . COOH$ und wenig Furfurol[1]) (Tollens[2]). So erhielten M. Conrad und M. Guthzeit[3]) bei 17-stündigem Erhitzen von 21 g Glukose mit 75 ccm Wasser und 5,2 g Schwefelsäure 0,3 g Huminsubstanzen, 1,1 g Laevulinsäure und 0,48 g Ameisensäure, während 17,5 g Traubenzucker unverändert zurückgewonnen wurden. Als der Versuch mit verdünnter Salzsäure angestellt wurde, nämlich mit 21 g Traubenzucker + 100 ccm Wasser + 9,2 g HCl, war die Ausbeute an Huminsubstanzen (1,9 g), Laevulinsäure (6,2 g) und Ameisensäure (2,6 g) erheblich größer wie bei dem ersten Versuche, andrerseits blieben hierbei nur 5,7 g des Zuckers unverändert. Bei dem Versuche mit 8,5 %iger Salzsäure wurden somit bei 17-stündigem Kochen über 60 % des Traubenzuckers zerstört.

Verhalten gegen konzentrierte Alkalilauge. Beim Erwärmen einer konzentrierten wässerigen Traubenzuckerlösung (1 + 1) mit einer ebenfalls konzentrierten wässerigen Kalilauge (1 T. KOH + 1/2 T. Wasser) erst auf 35°, dann auf 60° und zwar so lange, bis das Gemisch Fehling'sche Lösung nicht mehr reduziert, erhält man eine größere Menge, nämlich gegen 30 % des verwandten Traubenzuckers, an reiner Milchsäure (H. Kiliani[4]). Die Ausbeute an Milchsäure bei dieser Reaktion ist so ausgezeichnet, daß sie sich für eine Darstellung der Säure im größeren Maßstabe eignen dürfte.

Verbindungen mit Basen. Als mehrwertiger Alkohol läßt sich Traubenzucker mit stärkeren Basen, wie mit Aetzkali, Aetznatron, Aetzkalk und Aetzbaryt vereinigen; alle diese Verbindungen sind in absolutem Alkohol unlöslich. Das Natriumglykosat $C_6H_{11}O_6Na$ fällt auf Zusatz von Natriumalkoholat zu einer Lösung des Traubenzuckers in absolutem Alkohol als ein äußerst hygroskopisches Pulver aus. — Eine Lösung von d-Glukose in Methylalkohol wird durch eine methylalkoholische Barytlösung quantitativ ausgefüllt. — Traubenzucker verbindet sich mit Kupferhydroxyd zu einer Verbindung, die in Alkalilauge mit dunkelblauer Farbe löslich ist. Ein Niederschlag von der Zusammensetzung $C_6H_{12}O_6 . 5\ Cu(OH)_2$ entsteht beim Hinzufügen von 5 Mol. Kupfersulfat und mindestens 10 Mol. Aetznatron zu einer wässerigen Lösung von 1 Mol. Traubenzucker. Der unter diesen Bedingungen sich bildende Niederschlag löst sich in Natronlauge mit tief-

[1]) Furfurol = α-Furfuranaldehyd



[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 17, 2238 (1884).

[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 18, 439 (1885).

[4]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 15, 136 (1882).

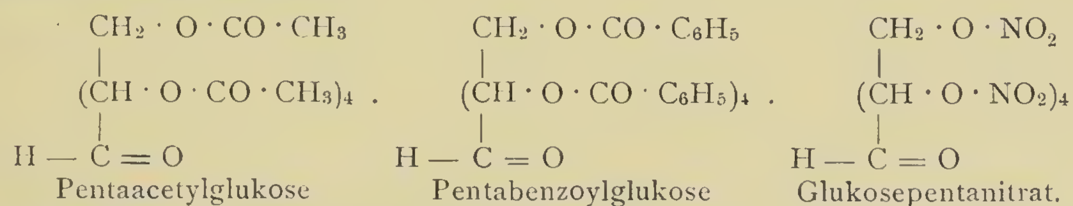
blauer Farbe auf und scheidet beim Erhitzen alles Kupfer als Oxydul (Cu_2O) ab.

Die wässerigen alkalischen, erdalkalischen und ammoniakalischen Lösungen des Traubenzuckers zersetzen sich in der Kälte langsam, aber ziemlich rasch beim Erhitzen, und zwar unter Gelb-, Braun- bis Schwarzfärbung. Unter den Zersetzungsprodukten des Traubenzuckers kann hierbei Milchsäure in beträchtlicherer Menge auftreten (s. oben). Kohlensaure Alkalien wirken ähnlich, aber schwächer wie die Aetzalkalien. Alkalische Traubenzuckerlösungen können daher selbst bei einer sehr schwach alkalischen Reaktion nicht ohne Verlust eingedampft werden.

Traubenzuckerester. Wie von allen Alkoholen lassen sich auch vom Traubenzucker Ester in der Weise ableiten, daß die Wasserstoffatome der fünf alkoholischen Hydroxyle, entweder alle fünf oder nur teilweise, durch Säureradikale ersetzt werden. Zwei isomere Pentaacetylglukosen entstehen beim Erwärmen von Traubenzucker mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat und ein Gemenge von Tetra- und Pentabenzoylglukose läßt sich beim Schütteln einer wässerigen Traubenzuckerlösung mit überschüssigem Benzoylchlorid und Natronlauge (von 10 % NaOH) gewinnen (E. Baumann, Kueny[1]).

Wie andere mehrwertigen Alkohole läßt sich auch Traubenzucker in einen Salpetersäureester, das d-Glukosepentanitrat, überführen, wenn man in die Lösung des Traubenzuckers in konzentrierter Salpetersäure Schwefelsäure eintropfen läßt..

Den erwähnten Estern des Traubenzuckers kommen die folgenden Konstitutionsformeln zu:



Pentaacetylglukose Pentabenzoylglukose Glukosepentanitrat.

Bildung von Methylimidazol. Durch Einwirkung von Zinkhydroxyd-Ammoniak[2]) auf Traubenzucker in der Kälte entsteht eine sauerstofffreie Base, das Methylimidazol (A. Windaus und F. Knoop[3]).

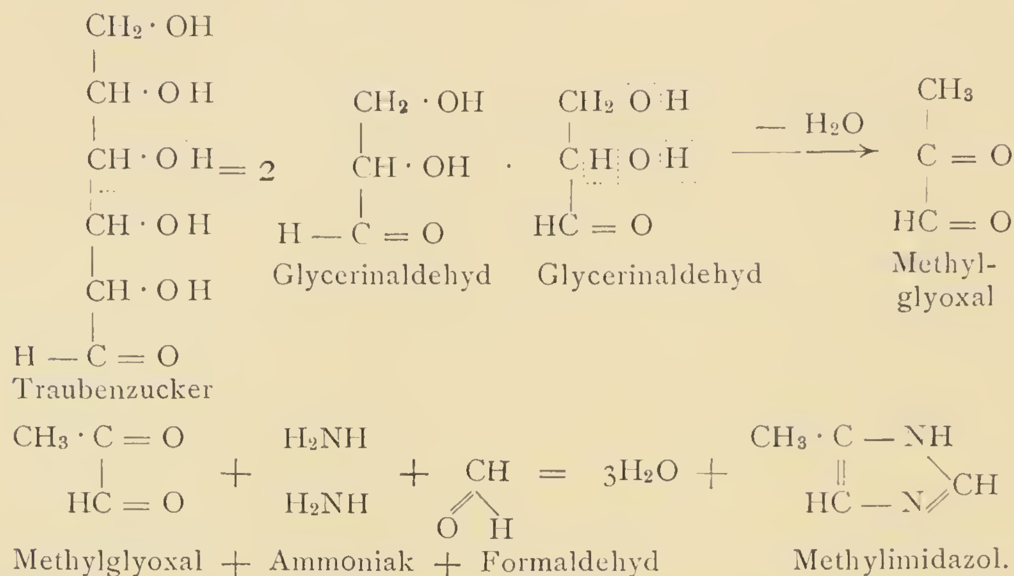
Diese Reaktion findet ihre Erklärung höchst wahrscheinlich darin, daß der Traubenzucker zunächst in Glycerinaldehyd zerfällt (Nef, Wohl, Buchner) und dieser unter Abspaltung von Wasser in Me-

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 19, 3220 (1886) und Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 330 (1890).

[2]) Gut ausgewaschenes und abgepreßtes Zinkhydroxyd $Zn(OH)_2$ aus 1 kg kristallisiertem Zinkvitriol wird in 1,5 kg wässerigem 25%igem Ammoniak gelöst, dann mit 1 kg festem Traubenzucker versetzt und verschlossen bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen.

[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38, 1166 (1905) und Hofmeisters Beiträge 6, 392 (1905).

thylglyoxal (neben Milchsäure) übergeht. Das so entstandene Methylglyoxal bildet dann nach allgemeiner Synthese der Imidazole mit gleichzeitig aus Traubenzucker hervorgegangenen Formaldehyd, der freilich auch sekundär aus Methylglyoxal entstanden sein kann[1]), und mit Ammoniak das Methylimidazol:



Gährungen. Traubenzucker geht in verdünnter wässeriger Lösung mit Hefe, bei Temperaturen zwischen 10 bis 40° in die alkoholische Gährung über, durch welche der Traubenzucker fast quantitativ in Aethylalkohol und Kohlendioxyd gespalten wird: $C_6H_{12}O_6$ + Hefe (Zymase = Enzym der Hefe) = $2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$.

Das Optimum der Temperatur für die weingeistige Gährung liegt bei etwa 34° C.

Die zu vergährende wässerige Lösung darf höchstens 15 % Traubenzucker enthalten, weil bei größeren Zuckerkonzentrationen der in zu großen Mengen gebildete Aethylalkohol die Hefezellen abtötet, so daß dann der Gährungsprozeß nicht zu Ende geht.

Durch verschiedene Bakterien, die »Milchsäurebazillen«, unterliegt Traubenzucker in verdünnt-wässeriger Lösung der Milchsäuregährung, die am besten bei Temperaturen von 35 bis 45° verläuft, und wenn gleichzeitig die gebildete Milchsäure durch Zinkoxyd, Calciumkarbonat oder Natriumbikarbonat neutralisiert wird:

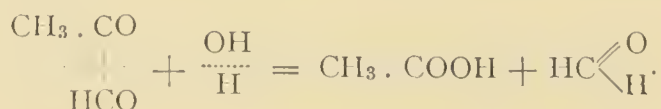


$$C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_6O_3 = \text{Milchsäure}.$$

Der Gährungsvorgang wird durch diese Gleichung nicht ganz richtig ausgedrückt, da die Milchsäuregährung von einer reichlichen Kohlensäureentwicklung begleitet ist. Solche Bakterien, welche Traubenzucker in Milchsäure überführen, finden sich regelmäßig in der sauren Milch und im Käse.

Die Milchsäuregährung kann, falls sich im Gährungsgemisch andere

[1]) Methylglyoxal kann nämlich zu Formaldehyd und Essigsäure hydrolysiert werden:



$$\begin{matrix} CH_3 . CO \\ HCO \end{matrix} + \frac{OH}{H} = CH_3 . COOH + HC\begin{matrix} O \\ H \end{matrix}.$$

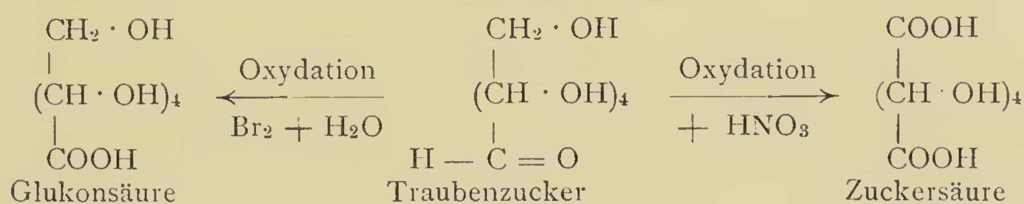
Bakterien, die »*Buttersäurebazillen*«, z. B. Bacillus butyricus, entwickeln, in die *Buttersäuregährung* übergehen. Die Milchsäure wird hierbei in n-Buttersäure, Kohlensäure und Wasserstoff gespalten:



$$2CH_3 . CH(OH) . COOH = CH_3 . CH_2 . CH_2 . COOH + 2CO_2 + 2H_2.$$

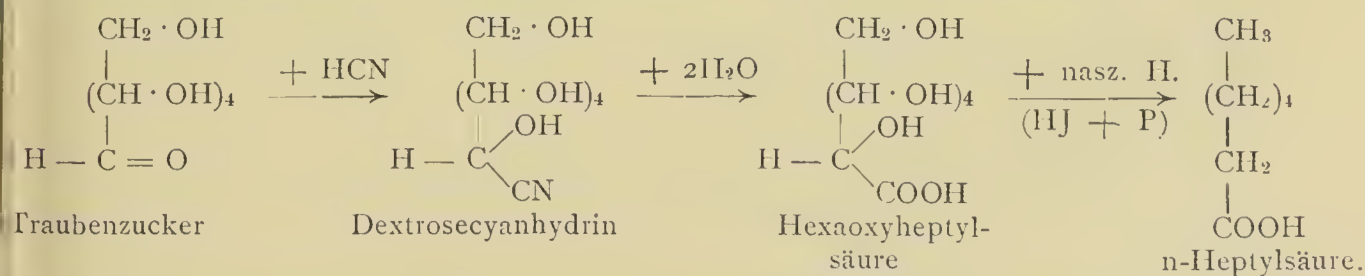
Ueber die Phenylglusosazonprobe und Farbreaktionen vgl. den Abschnitt »Nachweis des Traubenzuckers im Harn.«

Konstitution. Traubenzucker ist gleichzeitig *fünfwertiger Alkohol* und *Aldehyd*. Seine Alkoholnatur geht daraus hervor, daß er mit Metallen und Basen *Alkoholate*, Glykosate genannt, und mit Säuren, Säurechloriden und Säureanhydriden *Ester* bildet. Die Existenz einer *Pentaacetyl-, Pentabenzoylglukose* und eines *Glukosepentanitrats* (s. oben) beweist ferner, daß der Traubenzucker ein fünfwertiger Alkohol ist. Auf das Vorhandensein einer Aldehydgruppe im Molekül des Traubenzuckers schließen wir aus seinem starken Reduktionsvermögen gegen Silberoxyd, alkalische Quecksilber-, Kupfer- und Wismutlösungen und besonders daraus, daß er sich durch Chlor- oder Bromwasser in die einbasische Glukonsäure und durch Salpetersäure in die zweibasische Zuckersäure überführen läßt:



Diese Oxydationen vollziehen sich in der Weise, *daß die Kohlenstoffkette des Traubenzuckers nicht zertrümmert wird.*

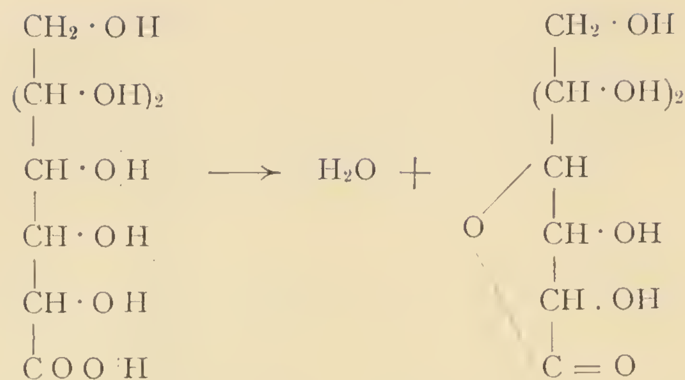
Den einwandsfreien Nachweis der jetzt angenommenen Konstitution des Traubenzuckers hat erst H. *Kiliani*[1]) geführt, nämlich durch Anlagerung von Cyanwasserstoff an den Traubenzucker, Verseifung des zunächst gebildeten Dextrosecyanhydrins zur Hexaoxyheptylsäure = Dextrosecarbonsäure und Reduktion der letzteren mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor zu *n-Heptylsäure*. Die Tatsache, daß hierbei schließlich n-Heptylsäure erhalten wurde, läßt sich nur mit der jetzt angenommenen Traubenzuckerformel in Einklang bringen.



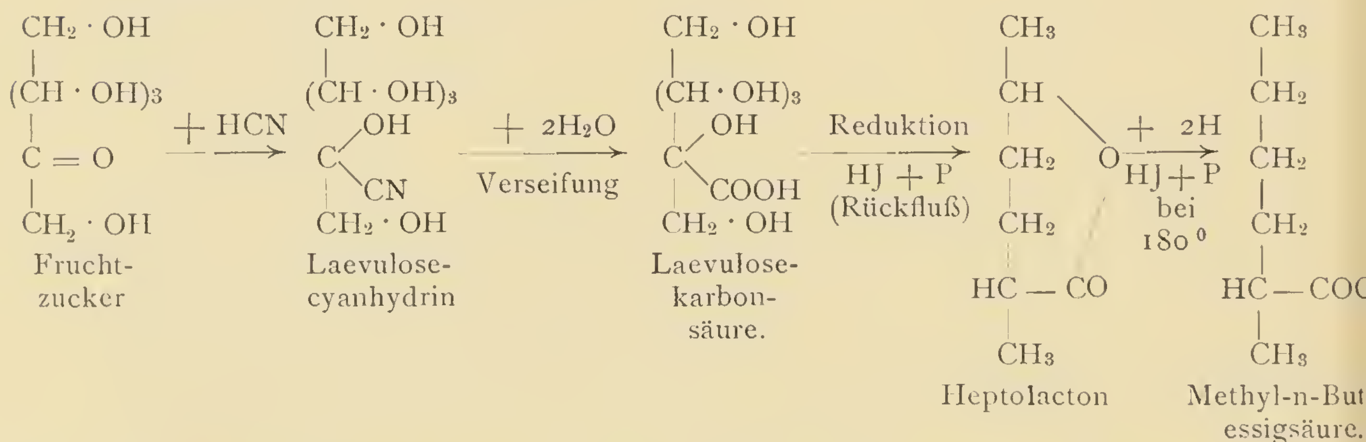
Die Hexaoxyheptylsäure oder Dextrosecarbonsäure wurde bei diesen Versuchen in Form ihres γ-*Lactons* erhalten:

---

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 19, 767, 1128 (1886).



In analoger Weise hatte Kiliani[1]) schon früher die Konstitution des Fruchtzuckers, der Laevulose, als $CH_2 \cdot OH \cdot (CH \cdot OH)_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot OH$ ermittelt: Das aus Fruchtzucker mit Hilfe einer mäßig konzentrierten Blausäure entstehende Laevulosecyanhydrin wurde mit rauchender Salzsäure in der Kälte zur sirupförmigen Laevulosecarbonsäure verseift, die beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor unter Rückfluß zunächst in ein Heptolacton, das α-Methylcaprolacton, überging, das dann bei mehrstündigem Erhitzen mit konz. Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor im geschlossenen Rohr auf 180° die entsprechende Heptylsäure lieferte. Die letztere erwies sich als identisch mit der aus Acetessigester darstellbaren Methyl-normal-Butylessigsäure.

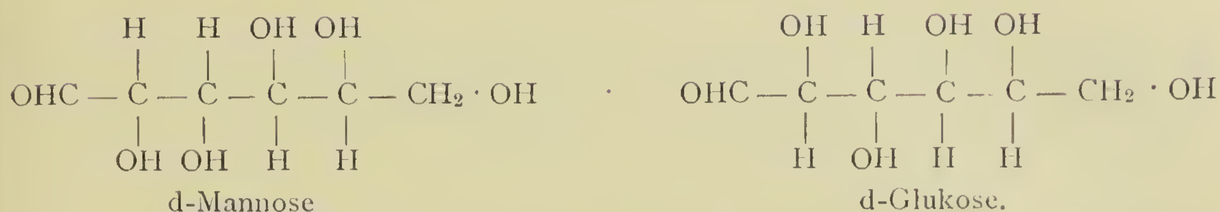


Bezüglich der Konstitution ist noch zu erwähnen, daß d-Glukose und d-Mannose[2]) stereoisomere Zucker sind, denn beide sind Aldehydzucker der Zusammensetzung $C_6H_{12}O_6$ und beide liefern beim Erwärmen mit überschüssigem essigsaurem Phenylhydrazin ein und dasselbe Phenylglukosazon (s. unten). Die Raumformeln der beiden Zucker sind die folgenden:

---

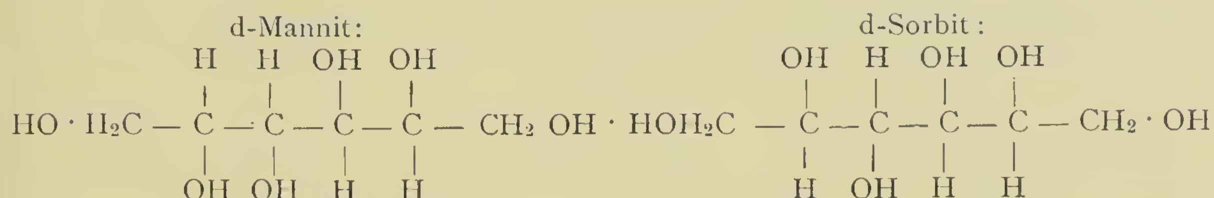
[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 18, 3066 (1885) und 19, 221 (1886).

[2]) d-Mannose entsteht durch Kochen von Salepschleim mit verdünnter Schwefelsäure sowie durch Einwirkung dieser Säure auf Reservecellulose, besonders auf diejenige der Steinnuß (Phytelephas macrocarpa). Sie wird neben Fruchtzucker gebildet, wenn natürlicher d-Mannit mit verdünnter Salpetersäure oder Platinmohr oxydiert wird. (Emil Fischer). — d-Mannose wird zunächst syrupförmig erhalten, geht aber bei längerem Aufbewahren unter absolutem Alkohol in eine harte, farblose, nicht kristallinische, sehr hygroskopische Maße über. d-Mannose gärt mit Hefe und reduziert Fehling'sche Lösung.



Durch Reduktion von d-Mannose und d-Glukose entstehen die entsprechenden stereoisomeren sechswertigen Alkohole, d-Mannit und d-Sorbit.

Die Raumformeln von



d-Sorbit und d-Mannit, d-Glukose und d-Mannose, d-Glukonsäure und d-Mannonsäure und demnach auch d-Zuckersäure und d-Mannozuckersäure unterscheiden sich nur durch die verschiedene räumliche Anordnung der einwertigen Atome (H-atome) oder Atomgruppen (OH-gruppen) an demjenigen Kohlenstoffatom, das in der d-Glukose und d-Mannose mit der Aldehydgruppe verbunden ist.

Synthese des Traubenzuckers nach Emil Fischer[1]).

Glycerin läßt sich mit verdünnter Salpetersäure oder mit Brom, in letzterem Falle bei Gegenwart von Natriumcarbonat, zu sogenannter Glycerose oxydieren, die ein Gemenge von Glycerinaldehyd und relativ viel Dioxyaceton (Glycerinketon) ist. Läßt man die wässerige Lösung von Glycerose mit 1% Aetznatron 2 Tage bei 0^0 stehen, so erfolgt aldolartige Kondensation der Glycerose zu Hexosen: 2 $C_3H_6O_3$ (Glycerose) = $C_6H_{12}O_6$ (Hexose).

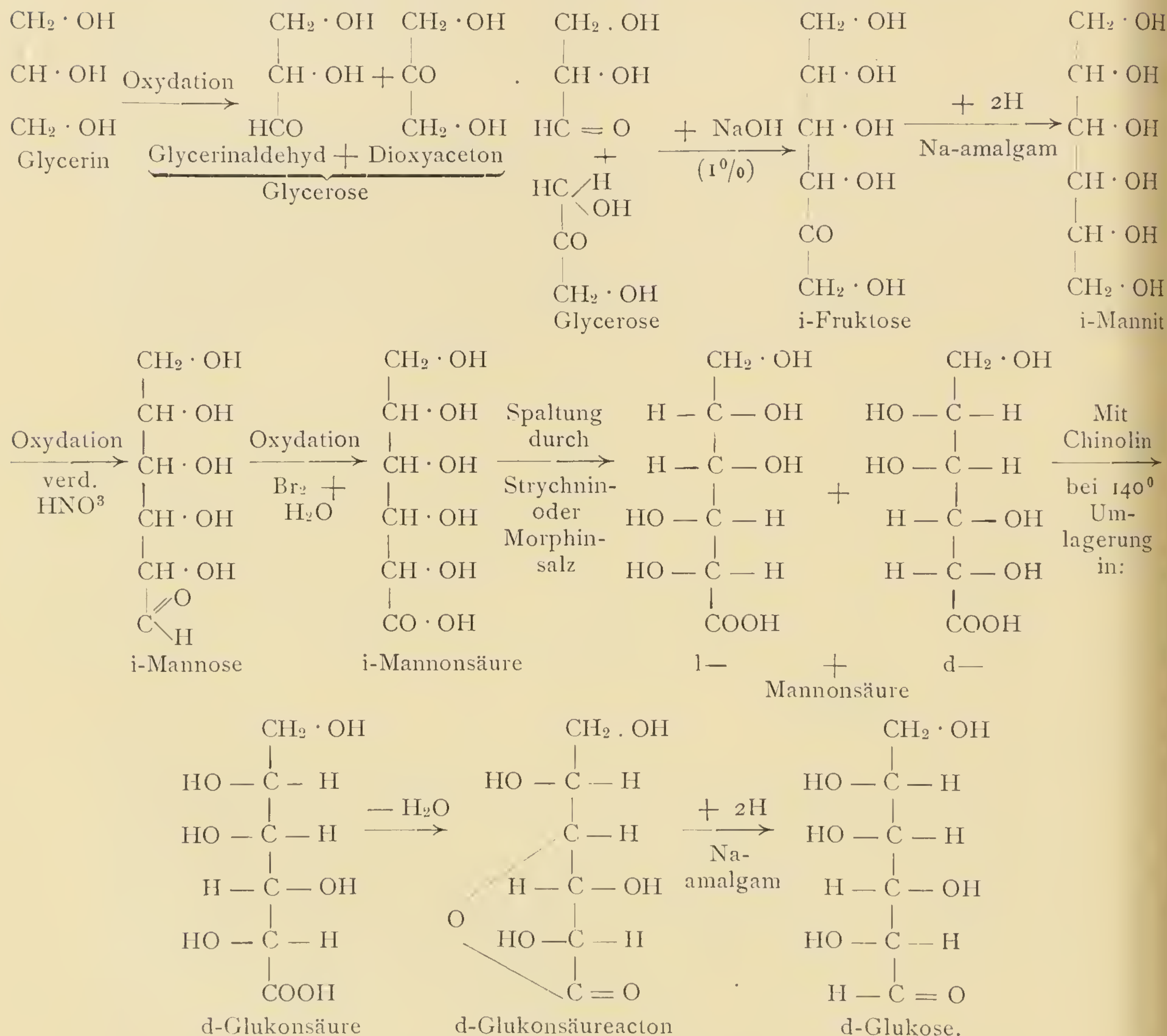
Hierbei entstehen mehrere Zucker, und zwar in größter Menge inaktive oder i-Fruktose (i-Fruchtzucker), früher α-Acrose genannt. Durch Reduktion der i-Fruktose mit Natriumamalgam entsteht der schön kristallisierende sechswertige Alkohol, inaktiver (i-)Mannit, früher α-Acrit genannt; hierbei wird die Ketongruppe der Fruktose zur sekundären Alkoholgruppe reduziert. Der i-Mannit läßt sich durch vorsichtige Oxydation mit Salpetersäure in den Aldehydzucker, die i-Mannose, und diese durch Bromwasser in die entsprechende Säure, die i-Mannonsäure, überführen. Durch Darstellung des Strychnin- oder Morphinsalzes der i-Mannonsäure und fraktioniertes Kristallisierenlassen bei bestimmter Temperatur wird die inaktive Säure in die optisch aktiven Komponenten gespalten; man erhält die betreffenden Alkaloidsalze der d- und l-Mannonsäure[2]). Um von der d-Mannonsäure zur d-

[1]) Emil Fischer, »Die Synthesen in der Zuckergruppe«. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 23, 2114 (1890).

[2]) Aus diesen beiden Säuren optisch aktiven Säuren läßt sich durch Reduk-

Glukose, also zum Traubenzucker, zu gelangen, erhitzt man die Säure mit Chinolin auf 140°, wobei sie teilweise in die stereoisomere d-Glukonsäure umgewandelt wird; umgekehrt geht die letztere unter denselben Bedingungen zum Teil in d-Mannonsäure über. Die sirupartige d-Glukonsäure geht beim Stehenlassen über Schwefelsäure in ihr kristallinisches Lacton, das d-Glukonsäurelacton, über, welches schließlich durch Natriumamalgam, also durch naszierenden Wasserstoff, zu d-Glukose oder Traubenzucker reduziert wird.

Die kurz skizzierten Reaktionen, welche vom Glycerin zum Traubenzucker führen, finden durch die folgenden Formeln ihre Erklärung:



Der Nachweis des Traubenzuckers im Harn.

Da besonders bei der leichteren Form des Diabetes sowohl die Art der Nahrung wie auch die Tageszeit, zu welcher der Harn gelassen wird, auf die Menge des ausgeschiedenen Traubenzuckers in dem Maße

tion die ebenfalls optisch aktive d- und l-Mannose sowie der d- und l-Mannit darstellen.

von Einfluß ist, daß der Morgenharn sogar zuckerfrei sein kann, so ist es unbedingt notwendig, den in Frage kommenden Harn entweder zu verschiedenen Zeiten am Tage zu untersuchen — Morgenharn, Harn nach den größeren Mahlzeiten, Harn naeh körperlichen Bewegungen —, oder aber man sammelt den in 24 Stunden gelassenen Harn, miseht ihn gut und verwendet alsdann diesen Tagesharn für die Prüfung auf Zucker. Ein trüber Harn muß vor dem Anstellen der Zuckerproben filtriert werden. — Enthält der zu untersuehende Harn Eiweiß, so muß dieses dureh Aufkochen des mit einigen Tropfen Essigsäure versetzten Harns und darauf folgende Filtration erst vollständig entfernt werden. Eine Probe des erkalteten Filtrats darf dann mit Essigsäure + Ferroeyankalium keine Trübung mehr geben.

1. **Die Trommer'sche Probe** beruht auf der Eigenschaft des Traubenzuckers, mit Kupferoxydsalz bei Gegenwart von Alkalilauge eine tiefblau gefärbte Lösung, eine alkalische Kupferoxydtraubenzuekerlösung, zu bilden, welehe beim Erwärmen gelbes Kupferoxydulhydrat CuOH oder rotes Kupferoxydul Cu_2O abscheidet. — Man versetzt den klaren Harn erst mit etwa $^1/_5$ Volumen Natronlauge (mit 10% NaOH), dann tropfenweise mit verdünnter Kupfersulfatlösung, bis das zunächst gefällte Kupferoxydhydrat $(Cu(OH)_2)$ sich beim Umsehütteln gerade noch löst oder bis höchstens eine Spur des letzteren ungelöst bleibt. Die bei Vorhandensein von Traubenzucker entstandene dunkelblaue Mischung erhitzt man, ohne umzuschütteln, ganz allmählieh zum Sieden. Enthält der Harn Traubenzucker, so bildet sich sehon unterhalb des Siedepunktes von der Oberfläehe aus, also in den oberen Schichten, ein gelber, gelbroter oder roter Niederschlag. Nur diese rasche, schon vor dem Koehen einsetzende Reduktion des Kupferoxyds ist für Traubenzucker eharakteristisch; ein beim Erkalten allmählich auftretender, flockiger, aus Erdphosphaten bestehender Niederschlag hat mit einem etwaigen Zuckergehalt des Harns nichts zu tun. Ebensowenig ist eine bloße Gelbfärbung des alkalischen Harn-Kupfergemisches beweisend für das Vorhandensein von Zueker.

Bemerkungen. Setzt man beim Anstellen der Trommer'schen Probe zu wenig Kupfersalz hinzu, so daß nicht die ganze Menge des vorhandenen Traubenzuckers durch das Kupferoxyd oxydiert werden kann, so wirkt die überschüssige Natronlauge beim Erwärmen auf den noch vorhandenen Traubenzucker ein, indem sich das Gemisch gelb bis braunrot färbt. — Hat man umgekehrt zu viel Kupfersalz zugesetzt, mehr als der Zucker zu reduzieren vermag, so mengt sich dem Kupferoxydul schwarzes Kupferoxyd [1]) bei, das die Farbe des ersteren verdecken kann. Man hüte sich daher auch vor einem zu großen Ueberschusse von Kupfersulfat.

An Stelle von Kupfersulfat + Natronlauge verwendet man mit Vorteil eine Fehling'sche Lösung, die beim Erhitzen für sich kein Kupferoxydul abscheidet. (Vgl. Titration mit »Fehling«). Ein Ueberschuß von »Fehling« wirkt nicht störend, weil überschüssiges Kupferoxyd durch das in der Lösung vorhandene

[1]) Kupferoxydhydrat, ein bläulich-weißer, gallertiger Niederschlag, geht beim Kochen mit Wasser in schwarzes Kupferoxyd über: $Cu(OH)_2 = CuO + H_2O$.

Kaliumnatriumtartrat in Lösung gehalten wird, während es andererseits bei Gegenwart von Traubenzucker zu Kupferoxydul reduziert wird.

In zuckerreicheren Harnen läßt sich der Zucker mittelst der Trommer'schen Probe leicht und sicher nachweisen. Anders verhält es sich mit zuckerärmeren oder mit solchen konzentrierten normalen Harnen, welche relativ reich an normalen, reduzierend wirkenden Harnbestandteilen sind. Verschiedenen normalen Bestandteilen des Harns, wie der Harnsäure, dem Kreatinin und dem Harnfarbstoff Urobilin kommen ebenfalls reduzierende Eigenschaften zu. Man kann daher sagen, daß jeder normale Menschenharn, besonders der konzentriertere beim Anstellen der Trommer'schen oder Fehling'schen Probe reduzierend wirkt. In den allermeisten Fällen kommt es freilich bei derartigen normalen Harnen nicht zur Ausscheidung von Kupferoxydul; nur färbt sich das Harngemisch häufig gelbrot und bleibt mehr oder wenig stark opalisierend. Das Kupferoxydul wird hauptsächlich von Kreatinin in Lösung gehalten. Es ist schon ein großer Ueberschuß von Kalilauge und Kupfersulfat notwendig, um die Kreatininkupferverbindung unter Abscheidung von Kupferoxydul zu zersetzen. Andererseits können Kreatinin und das gleichfalls im normalen Harne vorkommende Ammoniak[1]) bewirken, daß das durch den Traubenzucker des Harn gebildete Kupferoxydul in Lösung gehalten wird. Dies ist besonders der Fall, wenn ein Harn nur wenig Zucker enthält; solch kleinere Zuckermengen können dann leicht übersehen werden. — Um den schädlichen Einfluß der normalerweise im Menschenharne vorkommenden, reduzierend wirkenden Substanzen möglichst aufzuheben, verdünnt man den zu untersuchenden Harn vor dem Anstellen der Trommer'schen Probe zweckmäßig mit 3 bis 4 Tln. Wasser.

Ein Vortäuschen von Traubenzucker kann bei der Trommer-schen Probe dadurch zustande kommen, daß nach innerlicher Darreichung gewisser Arzneimittel im abgesonderten Harn reduzierend wirkende Substanzen wie gepaarte Glukuronsäuren sich vorfinden. Zu derartigen Arzneimitteln gehören unter anderen Chloralhydrat, Copaivabalsam, Kampher, Terpentin, Terpentinöl; ferner Salicylsäure, Sulfonal und Trional.

Fruchtzucker und Milchzucker geben ebenfalls die Trommer'sche Zuckerprobe.

2. **Böttger-Nylander'sche Wismutprobe.** Auch diese Probe ist eine Reduktionsprobe, die auf der reduzierenden Wirkung des Traubenzuckers auf Wismutoxyd beruht, das zu metallischem Wismut reduziert wird. Man verwendet für die Probe zweckmäßig das Almén-Nylander'sche Reagens[2]).

Man kocht etwa 10 ccm des eiweißfreien Harns mit 1 ccm des Reagenses 2—3 Minuten lang; enthält der Harn Traubenzucker, so färbt sich das Gemisch erst dunkelgelb, dann gelbbraun bis schwarzbraun oder schwarz, wird undurchsichtig und scheidet schließlich bei mehr oder weniger langem Stehen einen schwarzen Niederschlag ab, der aus Wismut und beigemengten Erdalkaliphosphaten besteht. Die Wismutprobe ist so empfindlich, daß sie noch 0,1% Traubenzucker im Harn

---

[1]) Ammoniak wird aus den Ammoniumsalzen des Harns durch die zugesetzte Natronlauge in Freiheit gesetzt.

[2]) Bereitung des Reagenses: Man löse 2 g basisches Wismutnitrat und 4 g Seignettesalz in 100 ccm Natronlauge (von 10% NaOH) unter Erwärmen auf dem Wasserbade und filtriere dann etwa ungelöst gebliebenes Wismutsalz ab.

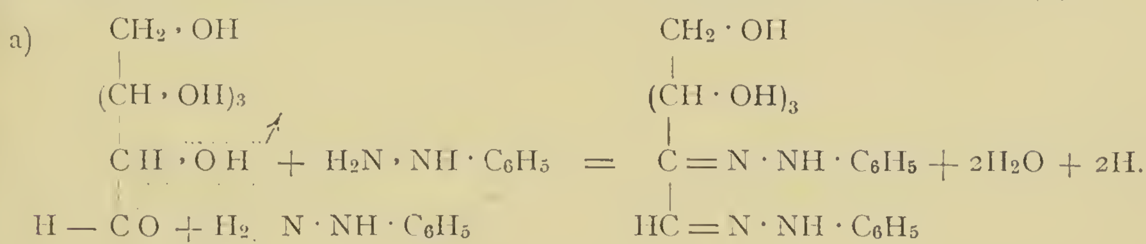
sicher auffinden läßt. O. Hammarsten[1]) sieht das Resultat als ein negatives an, wenn sich 5 Minuten nach beendetem Kochen keine schwarze oder nahezu schwarze Phosphatfällung abgesetzt hat.

Bemerkungen. Eiweißlösungen liefern beim Kochen mit Böttger-Nylanders Reagens schwarzes Schwefelwismut, das metallisches Wismut und somit auch Traubenzucker vortäuschen kann; ist Eiweiß in einem Harne vorhanden, so muß es daher nach den obigen Angaben erst entfernt werden. — Schwefelwasserstoff, der in einem gefaulten Harne sich vorfinden kann, gibt mit dem Reagens ebenfalls schwarzes Schwefelwismut; vorhandenen Schwefelwasserstoff entferne man daher erst vor dem Anstellen der Probe durch Schütteln mit Bleiessig und Abfiltrieren des Schwefelbleis und erhitze erst dann das klare Filtrate mit dem Nylander'schen Reagens.

Diejenigen Fehlerquellen, welche bei der Trommer'schen Probe durch Harnsäure, Kreatinin und Urobilin bedingt sein können, kommen bei der Wismutprobe in Wegfall. Wohl aber können sich Harne, auch wenn sie zuckerfrei sind, nach Einnahme bestimmter Arzneimittel beim Kochen mit dem Almén-Nylander'schen Reagens dunkler oder sogar schwarz färben. Dies ist der Fall nach dem innerlichen Gebrauche von Rheum, Senna, Santonin, Salicylsäure, Antipyrin, Acetanilid, Chloralhydrat und Terpentinöl.

Bemerkenswert ist ferner, daß auch Fruchtzucker und Milchzucker die Böttger-Nylander'sche Probe geben.

3. **Die Phenylhydrazinprobe.** Eine Traubenzuckerlösung gibt bei längerem Erwärmen mit einer essigsauren Lösung von Phenylhydrazin gelbe, zu konzentrischen Büscheln vereinigte Kristallnadeln von d-Phenylglukosazon. Zunächst kondensiert sich der Traubenzucker als Aldehyd mit dem Phenylhydrazin zu einem Hydrazon, aus welchem dann 2 Atome Wasserstoff austreten, indem die der Hydrazongruppe benachbarte sekundäre Alkoholgruppe CH · OH in die CO-gruppe übergeführt wird, die nun mit einem weiteren Mol. Phenylhydrazin unter Austritt von Wasser und Bildung von d-Phenylglukosazon in Reaktion tritt (a); der Wasserstoff wird hierbei nicht als solcher frei, sondern er spaltet ein weiteres Molekül Phenylhydrazin in Ammoniak und Anilin (b):



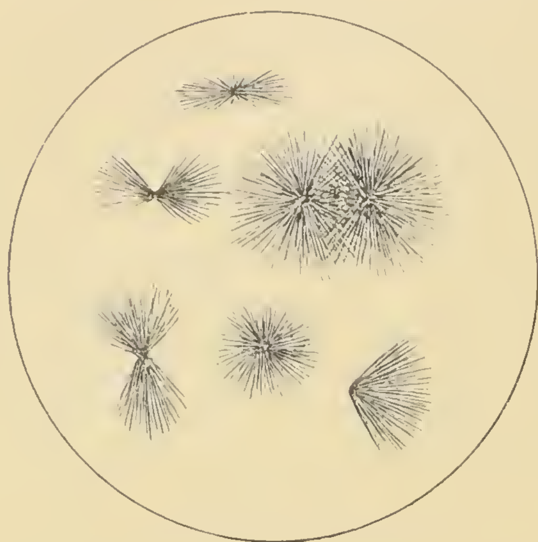


Ausführung. Man versetzt 5 bis 10 ccm des eventuell durch Kochen unter Essigsäurezusatz und Abfiltrieren von Eiweiß befreiten Harns mit einigen ccm einer zuvor filtrierten wässrigen Lösung von 2 Tln. salzsaurem Phenylhydrazin ($C_6H_5 \cdot NH \cdot NH_2 \cdot HCl$) und 1 Tl. kristallisiertem Natriumacetat ($C_2H_3O_2Na \cdot 3\ H_2O$), schüttelt um und erhitzt das Gemisch etwa 1/2 Stunde lang im Wasserbade. Nun läßt man

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 36 (1906/07).

abkühlen und untersucht einen entstandenen Niederschlag unter dem Mikroskop. Enthält der Harn Traubenzucker, so erhält man zu konzentrischen Büscheln vereinigte gelbe Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 202—203°, (Fig. 2), die aus Phenylglukosazon bestehen.

Fig. 2.



A. Neumann läßt 5 ccm eiweißfreien Harn mit 2 ccm mit Natriumacetat gesättigter 50%iger Essigsäure und 2 Tropfen reiner freier Phenylhydrazinbase in einem Reagensglase auf 3 ccm einkochen, nach raschem Abkühlen das Gemisch nochmals erwärmen und schließlich langsam abkühlen. Bei Gegenwart von nur 0,02% Traubenzucker scheiden sich dann in 5—10 Minuten meist schön ausgebildete Phenylglukosazonkristalle aus. Traubenzucker ist nur dann bestimmt nachgewiesen, wenn der erhaltene Niederschlag den Schmelzpunkt des Phenylglukosazons zeigt. Nach E. Roos liefert jeder normale Menschenharn eine Spur Phenylglukosazon; der physiologische Zuckergehalt ist daher nur dann überschritten, wenn schon 5 ccm des in Frage kommenden Harns eine ziemlich reichliche Kristallisation von Phenylglukosazon liefert. — Fruchtzucker und d-Mannose liefern das gleiche d-Phenylglukosazon vom Schmelzp. 202—203° wie der Traubenzucker.

Bemerkungen. d-Phenylglukosazon ist in kaltem Wasser fast unlöslich, in siedendem Wasser sowie in heißem verdünntem Alkohol leichter löslich und besonders leicht löslich in Pyridin (Carl Neuberg[1]); 1 g Pyridin löst in der Kälte 0,25 g, in der Siedehitze etwa 0,6 g des Osazons; aus solchen Lösungen wird es durch Benzol, Aether oder Ligroin fast vollständig wieder gefällt, ein Verhalten, das zur Reindarstellung des Phenylglukosazons mit Vorteil benutzt wird. Phenylglukosazon schmilzt nur bei raschem Erhitzen bei 203—205° und zwar unter Zersetzung.

4. **Die Gährungsprobe** beruht auf der Zersetzung des Traubenzuckers durch Hefe und Auffangen der neben Alkohol gebildeten Kohlensäure in einem Gährungsröhrchen; zweckmäßig führt man den Versuch in einer Schrötter'schen Gährungseprouvette aus. — Man durchschüttelt den betreffenden Harn, der sauer reagieren muß — andernfalls säure man den Harn mit Weinsäure schwach an — mit einem Stückchen frischer Bierhefe[2]), füllt den längeren Schenkel der Gährungseprouvette vollständig mit diesem Gemisch, schließt den unteren Teil der Eprouvette mit wenig Quecksilber ab und läßt das Gährungsgemisch bei 30 bis 36° 4 bis 6 Stunden stehen. Enthält der Harn Trauben-

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3384 (1899).

[2]) Man nehme auf 10 ccm Harn etwa 1 g Bierhefe.

zucker, so tritt in dem Gährungsgemisch je nach dem Zuckergehalte eine mehr oder weniger lebhafte Gasentwicklung ein, und in dem Gährungsrohr sammelt sich alsbald Kohlensäure an. Zur Kontrolle setzt man einen blinden Versuch mit normalem Harn und derselben Hefe an, um die hierbei auftretende, meist sehr geringe Gasmenge kennen zu lernen. Der in Frage kommende Harn darf nur dann als zuckerhaltig angesehen werden, wenn er bei der Gährungsprobe ein größeres Volumen Gas (Kohlensäure) liefert als der Kontrollversuch mit normalem Harn. — Kennt man die Wirksamkeit der verwendeten Hefe nicht, so empfiehlt es sich, die letztere, mit 1%iger Traubenzuckerlösung gemischt, in einem Gährungsrohre auf ihre Gährungsfähigkeit zu prüfen. H. Thierfelder[1]) gibt für die Gährungsprobe die folgende Vorschrift: Man erhitzt den frischen und unzersetzten, eventuell vorher von Blut und Eiweiß befreiten Harn in einem Kölbchen zum Kochen, erhält einige Minuten im Sieden, um Mikroorganismen zu vernichten, läßt abkühlen, fügt, falls er neutral oder alkalisch reagiert, Weinsäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu, kocht in diesem Falle zur Entfernung von Kohlensäure nochmals auf, läßt wieder erkalten und fügt erst dann ein Stückchen wirksame Bierhefe hinzu. Im übrigen verfährt man nach den oben gemachten Angaben.

Bemerkungen. In Ermangelung einer Gährungseprouvette kann man für den Gährungsversuch jedes beliebige Reagensglas benützen, welches mit dem Harn-Hefegemisch vollständig gefüllt, dann über Quecksilber, das sich in einem Porzellanschälchen befindet, aufgestellt wird. — Auch nach beendetem Gährungsversuche muß das Harn-Hefegemisch noch deutlich sauer reagieren; ist aber die Reaktion, etwa infolge eingetretener ammoniakalischer Harngährung, alkalisch geworden, so beweist das in der Gährungseprouvette angesammelte Gas gar nichts für das Vorhandensein von Traubenzucker; der Versuch muß dann mit einer neuen Harnprobe, die mit Weinsäure stärker angesäuert wird, in einem vorher stark erhitzten und wieder erkalteten Gährungsrohre wiederholt werden. In diesem Falle empfiehlt es sich ferner, den Harn vor der Gährungsprobe aufzukochen (s. oben).

Auch Fruchtzucker, der bisweilen im Harn vorkommt, vergährt ebenfalls mit Hefe zu Aethylalkohol und Kohlensäure.

5. **Die Polarisationsprobe.** Ist der zu untersuchende Harn klar und nicht zu sehr gefärbt, so füllt man mit ihm direkt das Zweidezimeterrohr eines empfindlicheren Polarisationsapparates und untersucht den Harn auf eine etwaige Rechtsdrehung. Ein trüber oder stärker gefärbter Harn wird erst mit fein zerriebenem Bleiacetat tüchtig geschüttelt und das Gemisch so oft durch ein Doppelfilterchen gegossen, bis ein absolut klares und fast farbloses Filtrat erhalten wird, das dann für die Polarisationsprobe geeignet ist. Ein alkalisch reagierender Harn muß vor dem Zusatze des Bleiacetats erst mit Essigsäure schwach angesäuert werden. Die Polarisationsprobe leistet vorzügliche Dienste zur Unterscheidung des Traubenzuckers von anderen, ebenfalls reduzierend wirkenden, aber linksdrehenden Substanzen wie von Fruchtzucker

[1]) Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 8. Aufl.

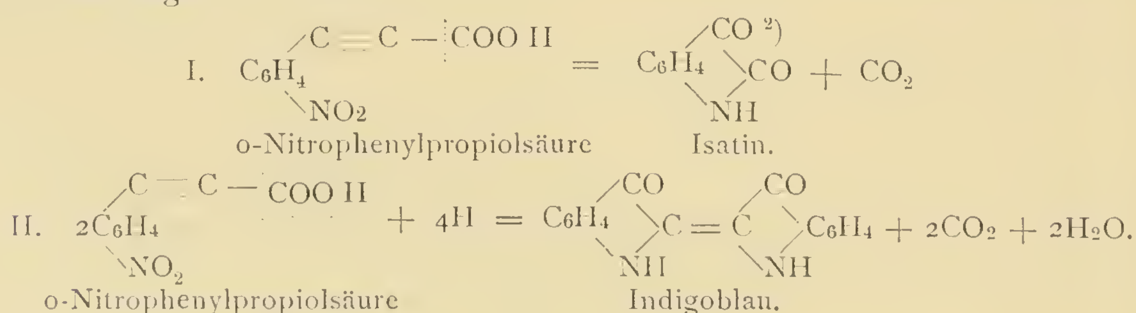
oder den gepaarten Glukuronsäuren, die nach Einnahme gewisser Arzneimittel — Chloralhydrat, Kampher, Terpentinöl — in reichlicherer Menge im Harne vorkommen können. Andrerseits setzt die Probe den Besitz eines empfindlicheren Polarisationsapparates voraus, mit Hilfe dessen noch kleinere Zuckermengen, von 0,3% und weniger Traubenzucker, sicher nachgewiesen werden können. — Der Harn, der polarisiert werden soll, darf kein Eiweiß enthalten, weil dieses die Ebene des polarisierten Lichtes nach links dreht. Aus einem eiweißhaltigen Harne muß daher das Eiweiß vor dem Anstellen der Polarisationsprobe durch Aufkochen unter Zusatz von wenig Essigsäure entfernt werden.

Auswahl der Proben. Die bis jetzt behandelten Traubenzuckerproben dürften für die Entscheidung der Frage, ob ein Harn Traubenzucker in pathologischer Menge enthält oder nicht, in den allermeisten Fällen ausreichen. Der gewissenhafte Untersucher wird sich, besonders in zweifelhaften Fällen, nicht mit einer einzigen Probe zufriedenstellen, sondern die sämtlichen, im Vorhergehenden beschriebenen und für Traubenzucker mehr oder weniger charakteristischen Proben anstellen.

Der Vollständigkeit halber läßt Verfasser noch einige der bekannteren Traubenzuckerproben folgen, von welchen verschiedene als klinische Proben in ärztlichen Kreisen beliebt sind.

6. Die Ortho-Nitrophenylpropiolsäureprobe von G. Hoppe-Seyler[1].

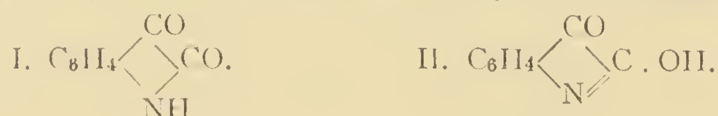
O-Nitrophenylpropiolsäure zerfällt beim Kochen mit Alkalilauge glatt in Isatin und Kohlendioxyd (I); wird diese Reaktion bei Gegenwart eines Reduktionsmittels wie von Traubenzucker oder Milchzucker vorgenommen, so entsteht Indigoblau (II). Diese von A. von Baeyer entdeckten Reaktionen beruhen darauf, daß die Sauerstoffatome der Nitrogruppe auf die ungesättigte orthoständige Seitenkette übertragen werden:



Auf der letzteren Reaktion beruht der Nachweis des Traubenzuckers im Harn nach G. Hoppe-Seyler: Man setzt zu 10 ccm einer 0,5%igen Lösung von O-Nitrophenylpropiolsäure in sehr verdünnter Natron-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 17, 83 (1893).

[2]) Dem Isatin kann man mit gleichem Rechte die Ketoformel I und die Enolformel II geben, da es die Erscheinung der Tautomerie zeigt:



lauge 10 bis 15 Tropfen des fraglichen Harns und kocht darauf 1/4 Minute lang; färbt sich das Gemisch durch gebildeten Indigo dunkelblau, so enthält der Harn wenigstens 0,4% Traubenzucker, oder es sind andere reduzierend wirkende Substanzen vorhanden, die etwa 0,4% dieses Zuckers entsprechen. Das Reagens muß stets im bedeutenden Ueberschusse vorhanden sein. — Traubenzuckerfreier Harn gibt besonders bei Anwesenheit von viel Kreatinin oder Indikan eine Grünfärbung, aber meist keine deutliche Blaufärbung. Im Harn vorhandenes Eiweiß stört die Probe nicht.

7. Die Moore'sche Probe. Man versetzt den zu untersuchenden Harn erst mit Kali- oder Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion und kocht dann einige Minuten lang; enthält der Harn Traubenzucker, so färbt er sich hierbei mehr oder weniger stark dunkelbraun. Auch normaler Harn färbt sich beim Kochen mit Natronlauge in der Regel dunkler, nämlich intensiver gelb oder bräunlich. — Die Moore'sche Probe ist recht empfindlich; 0,3% Traubenzucker, der normalem Harn zugesetzt wird, werden noch deutlich und sicher erkannt, besonders dann, wenn man die Färbung, die der fragliche Harn beim Kochen mit Natronlauge gibt, mit derjenigen eines normalen Harns vergleicht. — Mucinreichere Harne verhalten sich bei dieser Probe wie Zuckerharne. — Milchzucker, Galaktose und Pentosen reagieren mit Alkalilauge gerade so wie Glukose.

Bemerkungen. Der flockige Niederschlag, der sich aus dem alkalisch gemachten Harne, namentlich nach dem Kochen gut absetzt, und der aus Erdalkaliphosphaten besteht, hat selbstverständlich mit der Zuckerreaktion nichts zu tun. — Auch die kohlensauren Alkalien bewirken eine, wenn auch schwächere Farbenveränderung als Alkalilaugen, und ebenso färben die alkalischen Erden Traubenzuckerlösungen in der Wärme dunkler. — Bleisalze in Verbindung mit Ammoniak geben fleischfarbene oder rosenrote Niederschläge. Auf diesem Verhalten beruht die folgende Zuckerprobe.

8. Die Probe von Rubner[1]. Man fällt den zu untersuchenden Harn mit konzentrierter Bleiacetatlösung im Ueberschusse aus, filtriert ab, versetzt das Filtrat vorsichtig mit Ammoniak, so daß ein flockiger Niederschlag — Bleisaccharat neben Bleihydroxyd — entsteht und kocht auf; färbt sich der Niederschlag hierbei fleischfarben oder rosenrot, so ist Traubenzucker nachgewiesen. Die rote Färbung geht alsbald in Gelb über. Normaler Harn gibt die Probe nicht, zuckerhaltiger aber noch deutlich bei einem Gehalt von nur 0,1% Traubenzucker.

9. Die Diazobenzolsulfosäureprobe von F. Pentzoldt[2]. Man versetzt den betreffenden Harn erst mit Kalilauge oder Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion, dann mit einer Lösung von 1 Tl. Diazobenzolsulfosäure in 60 Tln. Wasser. Enthält der Harn Trauben-

[1]) Zeitschr. f. Biologie 20, 397 (1884).

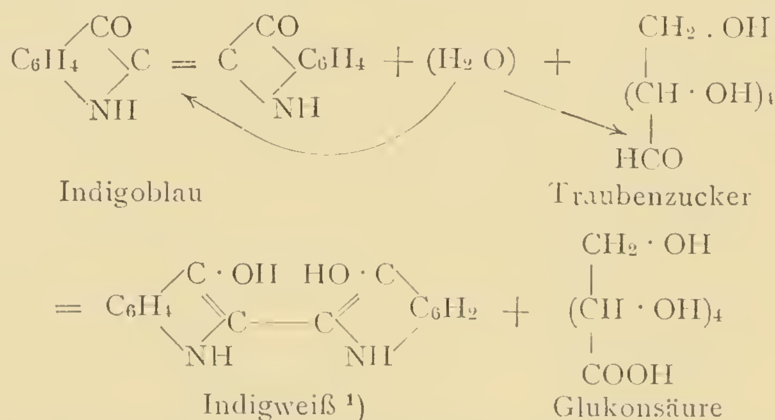
[2]) Berliner klinische Wochenschrift 1883, Nr. 14 und Zeitschr. f. analyt. Chem. 22, 466.

zucker, so nimmt das Gemisch eine gelbe bis bordeauxrote Färbung an, und bei stärkerem Zuckergehalt wird es dunkelrot und schließlich undurchsichtig. Mit Hilfe dieser Probe lassen sich noch 0,1% Traubenzucker nachweisen. Zum Vergleiche führe man eine Gegenprobe mit normalem Harn aus.

Bemerkungen. Nach ungefähr 1/4 Stunde bis spätestens 1 Stunde nimmt der Schaum des Zuckerharns, der mit dem Pentzoldt'schen Reagens versetzt ist, eine violette bis purpurrote Färbung an und ein Streifen Filtrierpapier färbt sich damit rosenrot. Der Schaum des normalen Harns ist nach der gleichen Zeit gelb und auch ein Filtrierpapierstreifen färbt sich gleichfalls gelb. — Andere Zucker sowie gewisse Gummiarten geben ebenfalls die Pentzoldt'sche Probe, aber nicht mit der gleichen Färbung wie Traubenzucker. Harnsäure und andere normale Harnbestandteile geben die Probe nicht. — Die Diazobenzolsulfosäure wird zweckmäßig unter Chloroform aufbewahrt.

10. Die Mulder'sche Indigoprobe. Versetzt man einen zuckerhaltigen Harn mit einigen Tropfen Indigolösung — man nehme eine wässerige Indigokarminlösung — bis zur deutlich blauen Färbung, dann mit Natriumcarbonatlösung bis zur alkalischen Reaktion und kocht auf, so geht die blaue Farbe des Gemisches in grünblau, grün, purpurrot und schließlich in gelb über. — Beim Schütteln des gelb gewordenen Gemisches mit Luft und zwar unter gleichzeitigem Abkühlen färbt es sich in umgekehrter Reihenfolge der Farben schließlich wieder blau.

Bemerkungen. Das Indigoblau wird bei dieser Probe durch den Traubenzucker, der wahrscheinlich zunächst zu Glukonsäure oxydiert wird, zu Indigweiß reduziert:

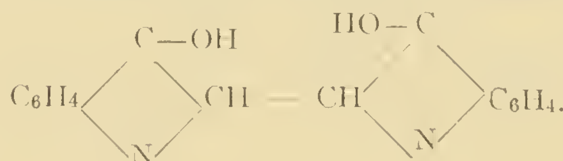


Indigweiß wird dann durch den Luftsauerstoff wieder zu Indigoblau oxydiert. Da das Alkalikarbonat teilweise zersetzend auf den Indigo einwirkt, kann man auch in der Weise arbeiten, daß man den zu untersuchenden Harn mit der Indigolösung aufkocht und erst dann Natriumkarbonatlösung bis zur alkalischen Reaktion hinzufügt.

11. Die Methylenblauprobe beruht auf der Entfärbung einer alka-

---

[1]) A. v. Baeyer (Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 15, 50 (1882)) hatte für das Indigweiß früher die folgende Konstitutionsformel aufgestellt:



lischen Methylenblaulösung durch den Traubenzucker. — 10 ccm des betreffenden Harns werden erst mit 5 ccm konzentriertem Bleiessig, aus 200 g Bleizucker + 100 g Bleioxyd + 1000 ccm Wasser bereitet, ausgefällt und nach dem Umschütteln durch ein trockenes Doppelfilterchen gegossen. Dann bringt man 5 ccm des meist wasserklaren Filtrats zu einem zum Sieden erhitzten Gemisch aus 5 ccm Methylenblaulösung (1 : 300) und 1 ccm Kalilauge von 10% KOH. Enthält der Harn Traubenzucker, so tritt nach 20—30 Sekunden Entfärbung ein, indem das Gemisch einen blaßgelben Farbenton annimmt. Schüttelt man dieses Gemisch alsdann mit Luft, so wird es durch Sauerstoffaufnahme wieder blau. Kreatinin und Harnsäure reduzieren Methylenblau nicht, wohl aber Aceton und gepaarte Glukuronsäuren. Ebenso entfärben indikanreiche Harne Methylenblau stark und rasch.

Die, wenn auch sehr empfindliche Methylenblaureaktion bietet im Vergleiche zu anderen Reduktionsproben des Traubenzuckers keine wesentlichen Vorteile.

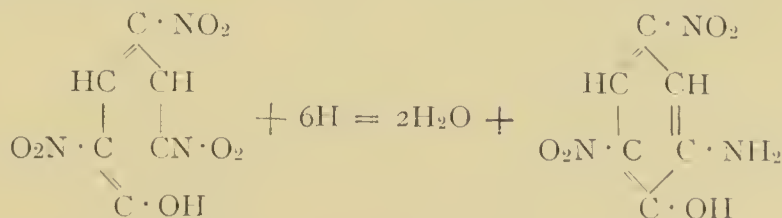
12. Die Pikrinsäureprobe beruht auf der reduzierenden Wirkung des Traubenzuckers gegen Pikrinsäure, welche zu Pikraminsäure oder 4,6-Dinitro-2-aminophenol reduziert wird [1]). Erwärmt man nämlich einen zuckerhaltigen Harn mit Kali- oder Natronlauge, bis er zitronengelb wird, fügt dann einige Tröpfchen sehr stark verdünnte Pikrinsäurelösung hinzu und kocht auf, so färbt sich das Gemisch tief rot.

Diese Zuckerprobe ist zwar sehr empfindlich, aber für Traubenzucker keineswegs charakteristisch! Denn abgesehen davon, daß sich eine Pikrinsäurelösung mit Alkalilauge schon rötlich färbt, gibt der normale Harnbestandteil Kreatinin schon in der Kälte und die Harnsäure beim Erwärmen eine ähnliche Färbung mit der alkalischen Pikrinsäurelösung wie Traubenzucker. Die Pikrinsäureprobe ist ganz überflüssig; man benutze sie daher zweckmäßigerweise überhaupt nicht zum Nachweis von Traubenzucker im Harn.

Die Furfurolproben von Molisch und von v. Udránszky sind keine speziellen Proben auf Traubenzucker, sondern auf Kohlehydrate überhaupt, die ja alle mehr oder weniger leicht mit Schwefelsäure Furfurol bilden. Da jeder normale Harn neben Spuren von Traubenzucker einen nicht gährungsfähigen Zucker sowie andere Kohlehydrate enthält, so gibt auch jeder Harn die Furfurolproben mehr oder weniger stark.

Vermischt man 0,5 bis 1 ccm Traubenzuckerlösung mit 2 Tropfen

[1]) Die Reduktion der Pikrinsäure zu Pikraminsäure findet in der folgenden Gleichung ihren Ausdruck:



Der Traubenzucker selbst wird oxydiert, wenn er die Pikrinsäure reduziert, vermutlich zuerst zu Glukonsäure, dann zu Zuckersäure.

einer 20%igen alkaholischen α-Naphtollösung[1] und fügt 1 bis 2 Volumen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so nimmt die Mischung beim Umschütteln, unter gleichzeitigem Abkühlen, eine tief violette, ins Purpurfarbene übergehende Färbung an, und beim Verdünnen mit Wasser entsteht ein blauvioletter oder tiefblauer Niederschlag. — Nach L. von Udránszky verfährt man in der Weise, daß man in einem trockenen, absolut reinen Reagensglase 1 ccm Harn mit 2 Tropfen der α-Naphtollösung mischt und alsdann vorsichtig 2 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure darunter schichtet. An der Grenzschicht entsteht dann ein grüner Saum, das Produkt der Einwirkung der Schwefelsäure auf das α-Naphtol, und darüber ein dunkelvioletter Ring. Schüttelt man jetzt unter guter Abkühlung um, so erscheint das Gemisch karminrot mit einem Stich ins Blaue und zeigt bei spektroskopischer Untersuchung einen schmalen, später verschwindenden Streifen zwischen D und E, sowie Verdunkelung von F an bis an das violette Ende.

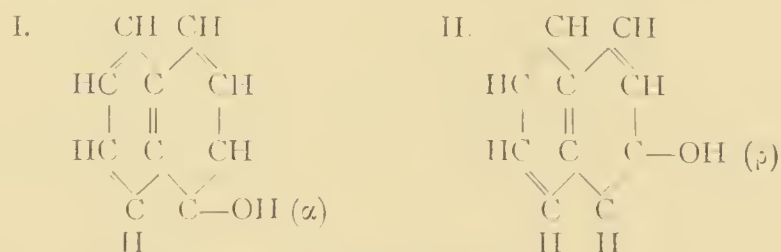
Bemerkungen. Ein Harn enthält wenigstens 0,5% d-Glukose, wenn ein Tropfen des vorher auf das Zehnfache verdünnten Harns noch die α-Naphtolprobe gibt (v. Udránszky[2]). Tritt bei diesem Grade der Verdünnung mit einem Tropfen keine positive Reaktion ein, so ist in dem Harn Traubenzucker in pathologischer Menge nicht vorhanden. Der Harn darf für diese Probe höchstens Spuren von Eiweiß enthalten. Ferner müssen die Probierröhrchen, in welchen die Versuche ausgeführt werden, absolut rein und besonders auch frei von Staub und Papierfasern sein.

Die quantitativen Bestimmungen des Traubenzuckers im Harn.

Der Traubenzucker im Harn kann nach verschiedenen Verfahren, nämlich maßanalytisch, durch Polarisation, durch Vergährenlassen, sowie auf kolorimetrischem Wege quantitativ bestimmt werden.

Die sämtlichen Titrirmethoden desselben beruhen auf der reduzierenden Wirkung des Aldehyds Traubenzucker gegen Kupferoxyd oder Quecksilberoxyd, und sie können daher als »Kupfermethoden« und »Quecksilbermethoden« unterschieden werden. Alle diese auf einer Reduktionsreaktion beruhenden Titrirmethoden des Traubenzuckers lassen den Zuckergehalt etwas zu hoch finden, da der Zuckerharn wie auch der normale Harn noch andere, ebenfalls reduzierend wirkende Stoffe wie Kreatinin, Harnsäure und Urochrom enthält. Je mehr Zucker und je

[1]) Wie von allen Monoderivaten des Naphtalins gibt es auch vom Monooxynaphtalin zwei Isomere, die als (α-I) und β-Naphtol (II) unterschieden werden.

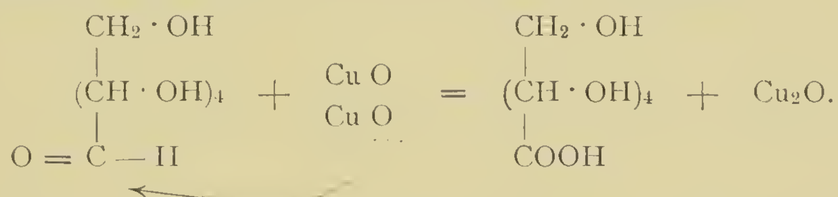


[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 386 (1888).

weniger von diesen anderen reduzierenden Stoffen in einem Harne vorhanden sind, umso geringer wird daher der Fehler bei der Titration des Traubenzuckers nach einer der Kupfer- oder Quecksilbermethoden.

1. Die Titration des Traubenzuckers nach Fehling.

Nach diesem Verfahren läßt man zu einer abgemessenen Menge der zum Sieden erhitzten Fehling'schen Lösung den entsprechend verdünnten Harn bis zur Entfärbung zufließen, d. h. so lange, bis alles Kupfer als Oxydul (Cu_2O) ausgefällt ist. 1 Mol. Traubenzucker reduziert hierbei nahezu 5 Mol. Kupferoxyd zu Oxydul. Die Menge Kupferoxyd entspricht aber keineswegs einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnisse, woraus hervorgeht, daß die Oxydation des Traubenzuckers nicht in einer einzigen Richtung verläuft. Nach Soxhlet[1]) ist die Menge Kupferoxyd, welche durch Traubenzucker reduziert wird, in erster Linie von der Konzentration der Fehling'schen Lösung abhängig; setzt man z. B. zu einer 1%igen Lösung von wasserfreiem Traubenzucker genau soviel Fehling'sche Lösung, als der Zucker gerade zu reduzieren vermag, so werden zur Oxydation von 1 Mol. Traubenzucker 5,26 Mol. Kupferoxyd reduziert, während von der gleichen, aber vorher auf das fünffache verdünnten Kupferlösung 5,055 Mol. Kupferoxyd verbraucht werden. Als erstes Produkt der Oxydation des Traubenzuckers durch »Fehling« dürfte die Glukonsäure entstehen:



Auch Ameisensäure, Tartronsäure und Glykolsäure sind als Produkte der Oxydation des Traubenzuckers durch »Fehling« nachgewiesen worden. Die letztere Säure dürfte hierbei aus der Tartronsäure hervorgehen, die beim Erhitzen Kohlendioxyd abspaltet und in Glykolsäure übergeht:



Milchsäure soll bei der Oxydation des Traubenzuckers mit »Fehling« höchstens in Spuren gebildet werden (F. Hoppe-Seyler).

Die Geschwindigkeit der Reduktion und die Temperatur, bei welcher die Reduktion vor sich geht, ist hauptsächlich von der Menge der zugesetzten Alkalilauge abhängig. Nimmt man auf 1 Mol. Traubenzucker und 5 Mol. Kupferhydroxyd nur 1 Mol. Aetzkali oder Aetznatron, so muß bis zur vollständigen Reduktion des Kupferoxyds stundenlang gekocht werden, während ein Zusatz von 2 Mol. Aetzkali die Kochdauer auf einige Minuten herabsetzt. Ist noch mehr Alkali vor-

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] 21, 254.

handen, so erfolgt die Reduktion schon unterhalb der Siedetemperatur.

Die Reduktion der Fehling'schen Lösung durch Traubenzucker erfolgt langsam schon bei Zimmertemperatur. Läßt man Fehlingsche Lösung mit einem Ueberschusse einer 0,5%igen Traubenzuckerlösung kalt stehen, so beginnt nach etwa 10 Minuten die Ausscheidung von Kupferoxydul und nach einigen Stunden ist das Gemisch entfärbt.

Bereitung der Fehling'schen Lösung. Man hält zwei Lösungen, nämlich eine Kupfersulfat- und eine alkalische Seignettesalzlösung, getrennt vorrätig. Werden gleiche Volumina dieser beiden Lösungen miteinander gemischt, so erhält man die fertige Fehling'sche Lösung.

Lösung I. Man löst 34,639 g reines kristallisiertes Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) in einem $^1/_2$ Liter-Meßkolben in warmem Wasser und füllt nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mit Wasser bis zur Marke auf.

Lösung II. Man löst ebenfalls in einem $^1/_2$ Liter-Meßkolben 173 g reines kristallisiertes Seignettesalz ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$) in Wasser auf, fügt 50 g Aetznatron hinzu und verdünnt die Lösung mit Wasser bis zur Marke.

Die fertige Fehling'sche Lösung ist nicht lange haltbar, auch wenn sie im Dunkeln aufbewahrt wird. Falls man eine fertige Lösung verwenden will, prüfe man erst eine mit der 4-fachen Menge Wasser verdünnte Probe derselben durch Aufkochen und Stehenlassen während mindestens $^1/_2$ Stunde. Scheidet sich hierbei ein roter Niederschlag (Cu_2O) nicht ab, dann ist die Lösung für den Versuch brauchbar.
20 ccm »Fehling« = 0,1 g Traubenzucker; somit 1 ccm »Fehling« = 0,05 g $C_6H_{12}O_6$

Ausführung. Die Titration mit Fehling'scher Lösung gibt nur dann ein richtiges, verwertbares Resultat, wenn der Harn 0,5 bis höchstens 1 Prozent Traubenzucker enthält, wenn also auf 20 ccm »Fehling« 10 bis 20 ccm des eventuell vorher verdünnten Harns verbraucht werden. Man bestimme daher vor der Titration das spez. Gew. des betreffenden Harns. Bei einem Harn mit dem spez. Gew. bis 1,030 wird man meist mit der fünffachen, bei noch höherem spez. Gew. mit der zehnfachen Verdünnung auskommen. — Ferner untersuche man den Harn vorher auf einen Gehalt an Eiweiß und entferne das Eiweiß falls es zugegen ist, durch Kochen von 50 oder 100 ccm des mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuerten Harns, Abfiltrieren des gefällten Eiweißniederschlags und Auswaschen desselben mit jeweils kleinen Mengen Wasser, bis das erkaltete Filtrat das ursprüngliche Harnvolumen ausmacht.

Nachdem der zu untersuchende Harn, eventuell in der angegebenen Weise vorbereitet ist, bringt man 20 ccm der frisch gemischten, in einer Bürette abgemessenen Fehling'schen Lösung in ein geräumiges Kochkölbchen aus Jenaer Glas, verdünnt mit 80 ccm Wasser, kocht auf, läßt 4 bis 5 ccm des ev. vorher verdünnten Harns aus einer Bürette zufließen, kocht wieder auf und unterhält das Sieden 1 bis 2 Minuten lang. Zeigt das Gemisch noch einen blauen Farbenton, so läßt man einen weiteren $^1/_2$ bis 1 ccm des Harns aus der Bürette zufließen, kocht wiederum auf und fährt in dieser Weise fort, bis die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit eben farblos geworden ist. Eine gelbe oder gar gelbbräunliche Färbung darf sie nicht zeigen, weil in

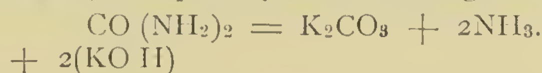
diesem Falle Traubenzucker schon im Ueberschusse zugesetzt ist, der dann beim Kochen mit der Alkalilauge diese Färbung bedingt. (Vergl. Moore'sche Probe.) — Scheidet sich das reduzierte Kupferoxydul nicht gut ab und ist die Endreaktion direkt nicht zu erkennen, so gießt man einige ccm durch ein doppeltes oder dreifaches Filterchen in ein Reagensglas und hält dann dieses gegen ein weißes Papier. Ist das Filtrat noch blau oder bläulich gefärbt, so gieße man es in das Kochkölbchen zurück und fahre mit dem Zusatz des Harns von je $^1/_2$ zu $^1/_2$ ccm in der angegebenen Weise fort, bis eben ein nicht mehr bläulich gefärbtes Filtrat erhalten wird. Durch die erste Bestimmung erhält man meist nur einen Näherungswert. Man wiederhole daher die Titration noch mindestens einmal mit je 20 ccm »Fehling«. Wird das zum Abfiltrieren des Kupferoxydulniederschlags benutzte Filterchen mit Wasser gründlich ausgespült, so kann es zum Filtrieren für mehrere Proben verwendet werden.

Berechnung. Da 20 ccm »Fehling« 0,1 g Traubenzucker entsprechen, so enthält somit die bis zum Entfärben der Fehling'schen Lösung verbrauchte Harnmenge 0,1 g Traubenzucker. Bei der Prozentberechnung ist schließlich die Verdünnung des Harns in Betracht zu ziehen. Hat man z. B. auf 20 ccm »Fehling« von einem auf das Fünffache verdünnten Harn 18 ccm verbraucht, so haben die letzteren 0,1 g Traubenzucker enthalten. Diese Menge $C_6H_{12}O_6$ war aber in 18 : 5 = 3,6 ccm des ursprünglichen Harns vorhanden. Nach der Proportion

$$3{,}6 : 0{,}1 = 100 : x \quad (x = 2{,}77)$$

hat der unverdünnte Harn somit 2,77% Traubenzucker enthalten.

Bemerkungen. Die früher allgemein übliche und auch jetzt noch in vielen Büchern empfohlene Methode, das klare Filtrat vom Kupferoxydulniederschlage nach dem Ansäuern mit Essigsäure mittelst Ferrocyankalium auf noch in der Lösung befindliches Kupfer zu prüfen, ist nach neueren Untersuchungen bei Harn nicht zulässig, weil das in der abfiltrierten Flüssigkeit durch deren Ammoniakgehalt gelöste Kupferoxydul in essigsaurer Lösung mit Ferrocyankalium ebenfalls einen braunen Niederschlag gibt. Durch Kochen des Harns mit der viel Alkalilauge enthaltenden Fehling'schen Lösung wird nämlich nicht nur aus den Ammoniumsalzen, sondern auch aus dem Harnstoff des Harns Ammoniak frei, das unter Umständen eine nicht unwesentliche Menge Kupferoxydul in Lösung halten kann.



$$CO(NH_2)_2 + 2(KOH) = K_2CO_3 + 2NH_3.$$

Obgleich aus dem spez. Gew. eines zuckerhaltigen Harns nicht direkt auf den Zuckergehalt zurückgeschlossen werden kann, so hat man doch unter gleichzeitiger Berücksichtigung des spez. Gew. und der 24 stündigen Harnmenge eine Wahrscheinlichkeitsskala zusammengestellt, aus der man den Prozentgehalt des Harns an Traubenzucker wenigstens annähernd feststellen kann.

Wahrscheinlichkeitsskala [1].

Tägliche Harnmenge	Spez. Gew.	Zuckergehalt.
1500 ccm	1,030	1 bis 2% $C_6H_{12}O_6$
3000 ccm	1,025	3 „ 4% $C_6H_{12}O_6$

[1]) Diese Wahrscheinlichkeitsskala ist der »Medizinischen Bibliothek für praktische Aerzte« Nr. 153 entnommen.

Tägliche Harnmenge	Spez. Gew.	Zuckergehalt
3000 ccm	1,030	5% und darüber
6000—3000 ccm	1,030	8% und darüber.

2. Die Bestimmung des Traubenzuckers nach Pavy, modifiziert von Kumagawa und Suto[1]).

Nach dem Verfahren von Pavy wird das aus der Fehling'schen Lösung durch den Traubenzucker reduzierte Kupferoxydul (Cu_2O) durch zugesetztes Ammoniak in Lösung gehalten. Verhindert man bei einem derartigen Versuche eine Oxydation des gelösten Kupferoxyduls durch den Luftsauerstoff, so erhält man schließlich eine farblose Lösung, wenn alles Kupferoxyd der Fehling'schen Lösung zu Oxydul reduziert ist. Der Eintritt der Entfärbung der stark ammoniakalischen Fehling-schen Lösung zeigt dann das Ende der Titration an. T. Kinoshita hat gefunden, daß bei der Pavy'schen Methode die besten Resultate erhalten werden, wenn der zu untersuchende zuckerhaltige Harn so weit verdünnt wird, daß er ungefähr 0,2 Prozent Traubenzucker enthält. Ein zuckerreicherer Harn muß also entsprechend verdünnt werden.

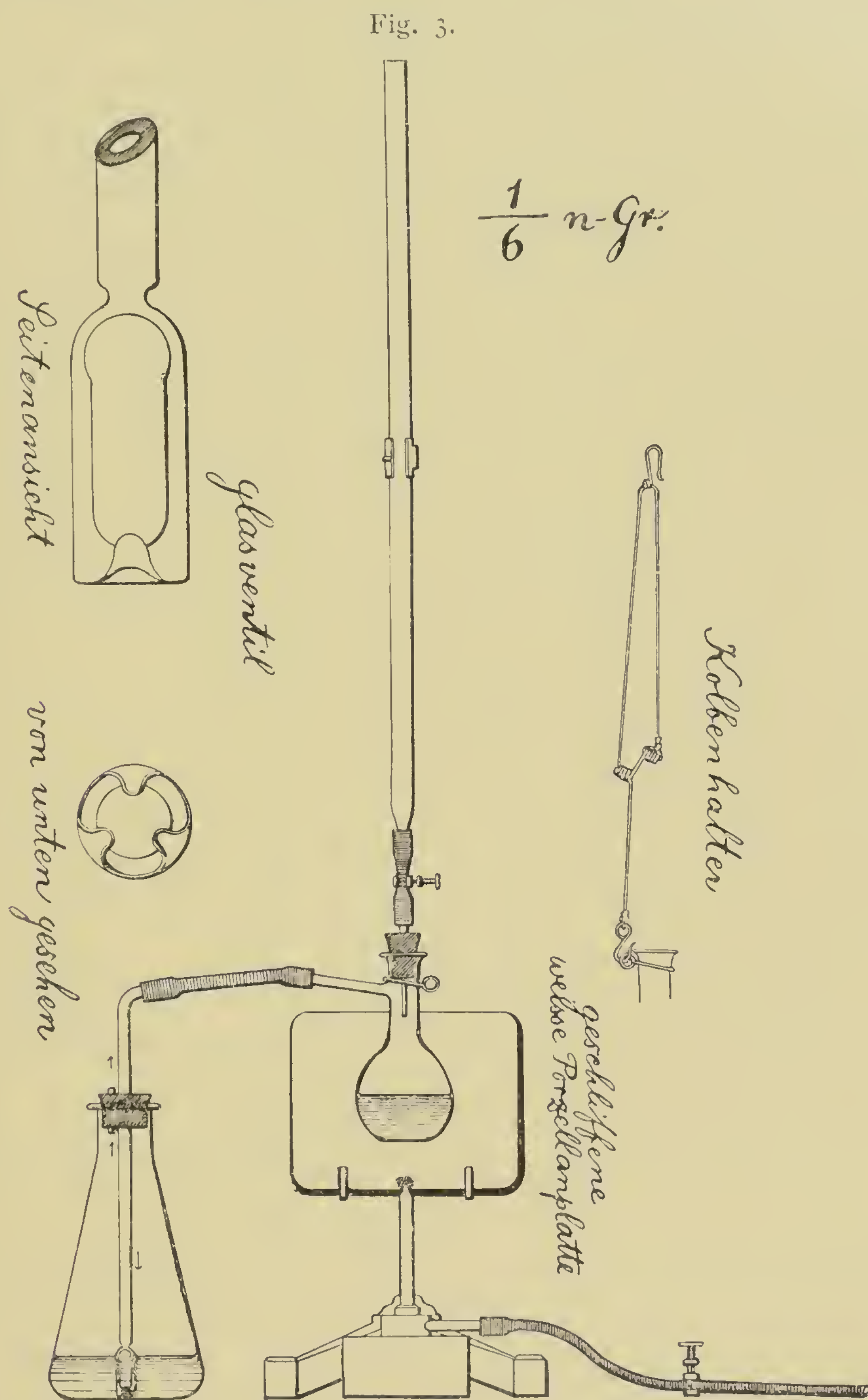
Erfordernisse. I. Kupfersulfatlösung. Man löse 4,278 g reines kristallisiertes Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) mit destilliertem Wasser zu 1 Liter. II. Alkalische Seignettesalzlösung. Man löse 21 g Seignettesalz und 21 g Aetzkali in Wasser auf, füge 300 ccm konzentrierte wässerige Ammoniakflüssigkeit (spez. Gew. 0,880) hinzu und verdünne mit destilliertem Wasser zu 1 Liter. Je 20 ccm der beiden Lösungen gemischt, geben 40 ccm fertige Pavy'sche Lösung. — Ferner ist für die Bestimmung ein geeigneter Apparat erforderlich. Vergl. die Abbildung Fig. 3. Der vorgelegte »Erlenmeyer« enthält 100 ccm Wasser, 2 ccm 10%iger Kupfersulfatlösung und 50 ccm konzentrierte Schwefelsäure; diese Säure soll das beim Sieden entweichende Ammoniak zurückhalten. Die angegebene Menge Schwefelsäure reicht für etwa 30 Bestimmungen. Das zugesetzte Kupfersulfat dient hierbei als Indikator.

Ausführung. In eine Bürette, deren Ausflußröhrchen, wie aus der Abbildung zu ersehen ist, in den Kochkolben hineinragt, bringt man den vorher stark verdünnten Harn, so daß er etwa 0,2% Traubenzucker enthält, und in den Kochkolben je 20 ccm der in Büretten abgemessenen beiden Pavy'schen Lösungen I und II. Nun erhitzt man zum Sieden und unterhält das Kochen 20—30 Sekunden, d. h. so lange, bis die Luft aus dem Kochkolben und der Pavy'schen Lösung ausgetrieben ist. Dies ist erreicht, wenn in der vorgelegten Schwefelsäure keine Luftblasen mehr aufsteigen. Nun wird die Gasflamme unter dem Kochkolben ganz klein, etwa bohnengroß gestellt, so daß die Flüssigkeit im Kolben sich fortdauernd im schwachen Sieden befindet. Man läßt dann aus der Bürette den verdünnten Harn langsam zufließen und zwar 2 bis 3 ccm in der Minute und so lange, bis die ursprüngliche blaue Farbe der

[1]) Pavy, The physiology of the Carbohydrates, London 1864. Kumagawa und Suto, Salkowski-Festschrift 1904. 211. T. Kinoshita, Biochemische Zeitschrift 9, 208 (1908).

Flüssigkeit fast verschwunden ist; nun läßt man 2 Minuten ruhig stehen; bleibt hierbei eine bläuliche oder mehr grünlichblaue Farbe bestehen, so läßt man noch 1 bis 2 Tropfen des verdünnten Harns aus der Bürette zufließen und wartet wiederum 2 Minuten. In dieser Weise

Fig. 3.



Apparat für die Bestimmung des Traubenzuckers im Harn nach Pavy-Kumagawa-Suto.

führt man mit dem Zufließenlassen des verdünnten Harns fort, bis eine grünliche Färbung gerade verschwindet. — Tritt eine schwache Gelbfärbung auf, so ist die Endreaktion bereits überschritten, und man hat schon zuviel von dem Harn zufließen lassen, denn diese Färbung ist dann

durch die Einwirkung der Alkalilauge auf den überschüssigen Traubenzucker bedingt (Moore's Probe). Man verwechsle übrigens diese Färbung nicht mit einer rötlichgelben, die durch ausgeschiedenes Kupferoxydul bedingt ist. Eine derartige Ausscheidung tritt immer dann ein, wenn sich infolge zu starken Kochens, was durchaus überflüssig ist, zu viel Ammoniak verflüchtigt hat. Nimmt man die vorgeschriebene kleine Flamme, so kann eine Ausscheidung von Kupferoxydul nicht eintreten.

Berechnung. 40 ccm der fertigen Pavy'schen Lösung entsprechen 0,01 g Traubenzucker. Diese Menge Traubenzucker ist somit in der beim Versuche verbrauchten Menge des verdünnten Harns vorhanden. Bei der Umrechnung auf Prozente ist die angewandte Verdünnung des Harns zu berücksichtigen.

Bemerkungen. Das Verfahren von Pavy leistet besonders dann vorzügliche Dienste, wenn der Harn wenig Zucker enthält und die normal vorkommenden, ebenfalls reduzierend wirkenden Stoffe des Harns, welche bei der Bestimmung des Traubenzuckers nach Fehling das Kupferoxydul in Lösung halten können, in größerer Menge vorhanden sind. Bei solchen Harnen scheidet sich das Kupferoxydul sehr unvollständig ab, und es ist daher die Endreaktion beim Titrieren nach Fehling garnicht oder nur schwer zu erkennen.

Die Titrierung nach Pavy muß unter Luftabschluß vorgenommen werden, wie bereits bemerkt wurde. — Das in die kupfersulfathaltige Schwefelsäure des Erlenmeyers eintauchende Glasrohr ist mit einem Glasventil versehen, wodurch ein Zurücksteigen der Flüssigkeit in den Kochkolben verhindert wird. Das der Schwefelsäure zugesetzte Kupfersulfat soll als Indikator dienen und anzeigen, wann die Säure durch das Ammoniak neutralisiert ist und durch neue Schwefelsäure ersetzt werden muß. — Kinoshita hat zur Ermittelung der Genauigkeit der Pavy'schen Methode im Vergleiche zu anderen Zuckerbestimmungsmethoden verschiedene Versuche angestellt, welche die folgenden Resultate ergeben haben:

Angewandt:	Gefunden nach:		
0,2%ige Lösung von	Allihn.	Knapp	Pavy
Traubenzucker.	0,20008 g	0,20346	0,19996% $C_6H_{12}O_6$
Differenz:	+ 0,008 g	+ 0,00346	— 0,00604 » .

Nach diesen Ergebnissen sind die Allihn'sche und Pavy'sche Methode die genauesten Methoden für die Zuckerbestimmung im Harn.

3. Die jodometrische Bestimmung des Traubenzuckers nach K. Lehmann-Riegler[1]).

Diese Methode ist eine Restmethode, nach der man den entsprechend verdünnten Zuckerharn mit einem Ueberschusse von Fehling'scher Lösung erhitzt und im Filtrate des Kupferoxydulniederschlags das überschüssige, noch in Lösung befindliche Kupfer jodometrisch bestimmt. Diese Bestimmung beruht auf der, von de Haën schon im Jahre 1854 aufgefundenen Reaktion, daß Jodkalium bei schwach saurer Reaktion mit Kupfersulfat eine dem Kupfer äquivalente Menge freies Jod liefert:

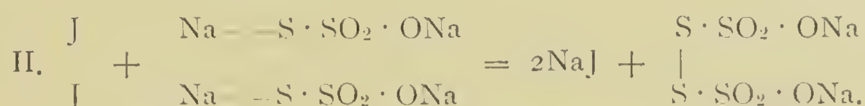


$$\text{I.}\quad \begin{matrix} CuSO_4 \\ +\ JK \end{matrix} + (KJ) = CuJ + K_2SO_4 + J.$$

[1]) K. Lehmann, Archiv f. Hygiene 30, 267 (1898). — E. Riegler, Zeitschr. f. analyt. Chem. 37, 22 (1898).

1 Atom Jod entspricht somit 1 Atom Kupfer.

Das bei dieser Reaktion frei gewordene Jod wird dann in der üblichen Weise durch Titration mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung bestimmt:



$$\text{II.}\quad \begin{matrix} J \\ J \end{matrix} + \begin{matrix} Na-S\cdot SO_2\cdot ONa \\ Na-S\cdot SO_2\cdot ONa \end{matrix} = 2NaJ + \begin{matrix} S\cdot SO_2\cdot ONa \\ | \\ S\cdot SO_2\cdot ONa. \end{matrix}$$

Da somit 1 Mol. Natriumthiosulfat 1 Atom Jod (II) und das letztere wieder 1 Atom Kupfer (I) entspricht, so entsprechen sich auch 1 Mol. Natriumthiosulfat und 1 Atom Kupfer (= 63,57).

1000 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfat, die $^1/_{10}$ Grammolekül $Na_2S_2O_3$ gelöst enthalten, entsprechen demnach $^1/_{10}$ Gramatom Kupfer = 6,357 g Cu.

Somit 1 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung = 0,006357 g Cu.

Die Fehling'sche Lösung enthält in 1000 ccm 34,639 g $CuSO_4 + 5H_2O$, was einem Gehalt von 8,829 g metallischem Kupfer entspricht, oder in 1 ccm »Fehling« sind 0,008829 g Kupfer gelöst. 20 ccm »Fehling« enthalten somit 0,17658 g Cu.

Wenn die Fehling'sche Lösung richtig hergestellt und die Natriumthiosulfatlösung von $^1/_{10}$-Normalität ist, so entsprechen demnach 20 ccm »Fehling« mit 0,17658 g Kupfer nach der Proportion

$$\begin{matrix} g\ Cu : {}^1/_{10}\ n\text{-}Na_2S_2O_3. \\ 8{,}829 : 1000 = 0{,}17658 : x\ (x = 27{,}8) \end{matrix}$$

27,8 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung.

Die Kontrollierung der Fehling'schen Lösung führe man daher in der Weise aus, daß man 20 ccm desselben erst mit ca. 100 ccm Wasser und 2 ccm reiner konz. Schwefelsäure versetzt, erkalten läßt, dann 1 g in wenig Wasser gelöstes Jodkalium zufügt und dieses Gemisch 10 Minuten lang stehen läßt. Alsdann läßt man $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung bis zur schwachen Gelbfärbung zufließen, gibt nun Stärkelösung hinzu und titriert weiter bis zum Verschwinden der blauen Färbung. Werden hierzu nicht 27,8 ccm der Thiosulfatlösung verbraucht, sondern z. B. 26,8 ccm, so rechnet man den »Faktor« aus; dann entspricht für den angenommenen Fall 1 ccm der untersuchten Fehling'schen Lösung 26,8 : 27,8 = 0,964 ccm einer richtigen Fehling'schen Lösung.

Ausführung. Man kocht in einem Erlenmeyerkolben 60 ccm Fehling'sche Lösung mit 25 ccm des ev. vorher entsprechend verdünnten Harns, der höchstens 1% Traubenzucker enthalten darf, 2 Minuten lang, bringt dann das Flüssigkeitsgemisch samt Niederschlag unter Nachspülen des Kolbens in einen 250 ccm-Maßkolben, füllt nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mit Wasser bis zur Marke 250 auf, schüttelt um und mißt nach dem Absetzen des Kupferoxyduls 50 ccm von der klaren, über dem Niederschlage stehenden Flüssigkeit ab. Zu dieser Menge gibt man 2 ccm in einem kleinen Meßzylinder abgemessene reine konz. Schwefelsäure, ferner nach dem Erkalten eine Lösung von 3 g Jodkalium in 100 ccm Wasser und titriert nun nach 10 Minuten das hierbei frei gewordene Jod mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung auf

Gelb und, nach Zusatz einer guten Stärkelösung, bis zum Verschwinden der blauen Farbe.

Berechnung. Die für die jodometrische Bestimmung abgemessenen 50 ccm = der fünfte Teil der Gesamtflüssigkeitsmenge entsprechen somit 5 ccm des abgemessenen ev. vorher verdünnten Harns sowie 12 ccm »Fehling«. Nach der obigen Betrachtung entsprechen 27,8 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung 20 ccm einer richtigen Fehling'schen Lösung; somit entspricht 1 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfat 0,72 ccm »Fehling« (abgerundet[1]). Man hat also die bei der Titration verbrauchte Anzahl ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfat mit 0,72 zu multiplizieren und dieses Produkt von 12 abzuziehen, um in Kubikzentimetern die Menge Fehling'scher Lösung zu erfahren, die vom Traubenzucker von 5 ccm des ev. vorher verdünnten Harns verbraucht wurde.

Beispiel. Der für die Bestimmung verwandte Harn war auf das Fünffache verdünnt. Verbraucht wurden bei der Titration 11 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfat; diese entsprechen 11 $\times$ 0,72 = 7,9 ccm »Fehling«. 12—7,9 = 4,1 ccm »Fehling« kommen somit auf den Zucker von 5 cm des verdünnten oder auf 1 ccm des ursprünglichen Harns. Da 1 ccm »Fehling« von 0,005 g Traubenzucker reduziert wird, so entsprechen die 4,1 ccm Fehling 4,1 $\times$ 0,005 = 0,0205 g $C_6H_{12}O_6$ = Menge Traubenzucker von 1 ccm Harn. Der untersuchte Harn hat somit 2,05% Traubenzucker enthalten.

Bemerkungen. E. Rupp und F. Lehmann[2]) haben das Lehmann'sche Verfahren der Zuckerbestimmung in der folgenden Weise modifiziert: Bei einem spez. Gew. des Harns bis 1,023 werden 50 ccm Harn, bei einem solchen von 1,033 werden 25 ccm und bei einem noch höheren spez. Gew. werden nur 10 ccm Harn für den Versuch abgemessen. — Zu dem abgemessenen Harn wird in einem 100 ccm-Meßkölbchen bis etwa 85 ccm Wasser hinzugegeben, dann 2—3 ccm Bleiessig und nach dem Umschütteln, zur Ausfällung des überschüssigen Bleis, 6 bis 8 ccm Natriumkarbonatlösung (1 : 4); schließlich wird mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und nach dem Umschütteln durch ein trockenes Filter filtriert.

Nun erhitzt man ein Gemisch aus je 15 ccm der beiden Fehling'schen Lösungen — also 30 ccm der fertigen Fehling'schen Lösung — und 25 ccm Wasser zum Sieden, läßt 20 ccm des hergestellten Harnfiltrates zufließen, kocht 2 Minuten, kühlt rasch ab und gießt dieses Gemisch in eine Lösung von 2 g Jodkalium in 25 ccm verdünnter Schwefelsäure. Schließlich titriert man das freigewordene Jod in der oben angegebenen Weise unter Verwendung einer guten Stärkelösung als Indikator.

4. Die Bestimmung des Traubenzuckers nach Ivar Bang[3]).

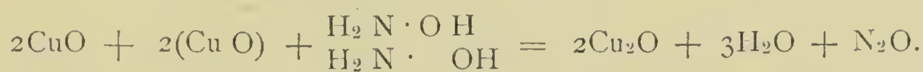
Die Bang'sche Methode der Traubenzuckerbestimmung ist wie die bis jetzt behandelten Methoden eine Kupfermethode und zwar eine Restmethode. Als Kupferlösung wird eine viel Kaliumrhodanid, Kaliumcarbonat und Kaliumbicarbonat enthaltende Kupfersulfatlösung angewandt. Wird ein zuckerhaltiger Harn mit dieser »blauen Bang'schen

[1]) Genau ausgerechnet entspricht 1 ccm $^1/_{10}$n-Natriumthiosulfatlösung 0,7198 ccm Fehling'scher Lösung.

[2]) Apotheker-Zeitung 24, 73 (1909).

[3]) Biochemische Zeitschrift 2, 271 (1907).

Lösung« zum Sieden erhitzt, so wird das Kupferoxyd der Lösung nicht zu rotem Kupferoxydul, sondern zu weißem Kupferrhodanür CuSCN reduziert, das durch das überschüssige Rhodankalium der Lösung als farblose Doppelverbindung gelöst bleibt. — Der Ueberschuß an Kupferlösung wird mit Hilfe einer eingestellten Lösung von schwefelsaurem Hydroxylamin $NH_2 \cdot OH \cdot H_2SO_4$ zurückgemessen, indem man hierbei auf farblos titriert. Das Hydroxylamin wird vom Kupferoxyd zu Stickstoffoxydul (neben Stickstoff) und Wasser oxydiert:



$$2CuO + 2(Cu\,O) + \begin{matrix} H_2N \cdot O\,H \\ H_2N \cdot \quad OH \end{matrix} = 2Cu_2O + 3H_2O + N_2O.$$

Bei Gegenwart von viel Rhodankalium scheidet sich auch hierbei kein Kupferoxydul aus, sondern dieses bleibt als Kupferrhodanürdoppelsalz in Lösung.

Erfordernisse. 1. Blaue Bang'sche Lösung. Man löst 12,5 g reines kristallisiertes Kupfersulfat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 75 ccm warmem Wasser und kühlt diese Lösung auf Zimmertemperatur ab. Andrerseits löst man in einem 1 Liter-Meßkolben 200 g Rhodankalium, 250 g Kaliumkarbonat und 50 g Kaliumbikarbonat zusammen in etwa 600 ccm Wasser und zwar unter Erwärmen auf höchstens 50°. Man läßt auch diese Kaliumsalzlösung auf Zimmertemperatur abkühlen und gießt dann die Kupfersulfatlösung unter Umschütteln langsam hinzu. Schließlich verdünnt man mit Wasser bis zur Marke 1 l, schüttelt um und filtriert die Lösung nach 24 Stunden, besser erst nach 2 Tagen. Beim Lösen der Kaliumsalze steigere man die Temperatur nicht über 50°, weil sonst aus dem Kaliumbikarbonat Kohlensäure frei wird.

Die blaue Bang'sche Lösung ist längere Zeit unverändert haltbar.

2. Weiße Bang'sche Lösung. 6,55 g schwefelsaures Hydroxylamin und 200 g Rhodankalium werden zusammen in Wasser auf 2 Liter gelöst. Die weiße Lösung ist nur wenige Wochen unzersetzt haltbar. 1 ccm weiße Lösung entfärbt 1 ccm blaue Lösung.

Ausführung. Je nach dem vermuteten Zuckergehalt werden verschieden große Mengen Harn abgemessen. Von einem Harne, der weniger als 0,5% Traubenzucker enthält, werden 10 ccm abgemessen, von einem zuckerreicheren je nach dem Zuckergehalt 5 oder nur 2 ccm. Ein zuckerreicherer Harn wird also vor der Bestimmung mit Wasser auf das Fünf- oder Zehnfache verdünnt. In jedem Falle muß aber die Menge der für die Titration zu benutzenden Harnflüssigkeit 10 ccm betragen.

Man bringt 10 ccm des eventuell vorher verdünnten Harns in ein Kochkölbchen aus Jenaer Glas von 200 bis 250 ccm Inhalt, fügt 50 ccm blaue Bang'sche Lösung hinzu, erhitzt das Gemisch auf einem Drahtnetze (nicht einer Asbestplatte) zum Sieden und hält es genau drei Minuten lang im lebhaften Kochen. Das Flüssigkeitsgemisch muß jetzt noch intensiv blau gefärbt sein, andernfalls ist die Bestimmung mit weniger Harn z. B. 3 ccm Harn + 7 ccm Wasser, oder einem verdünnteren Harne zu wiederholen.

Man kühlt nun das Kochkölbchen rasch auf Zimmertemperatur ab und läßt die Hydroxylaminlösung aus einer Bürette bis zum Verschwinden

der blauen Farbe zufließen. Die Eigenfarbe des Harns erschwert das Erkennen der Endreaktion mehr oder weniger, indem eine vollkommene Entfärbung des Harnkupfergemisches durch Hydroxylamin meist überhaupt nicht zu erreichen ist. Meistens erfolgt ein langsam eintretender unscharfer Farbenwechsel von blau in grünblau, grünlich und schließlich in bräunlich oder goldgelb. Dieser unscharfe Farbenwechsel macht eine scharfe Titration auf 1 oder 2 Tropfen Hydroxylaminlösung unmöglich; man muß sich vielmehr damit begnügen, wenn das Ende der Reaktion auf 0,5 ccm Hydroxylaminlösung gefunden wird.

Berechnung. Aus der untenstehenden Tabelle kann man die Menge Traubenzucker in Milligrammen ablesen, welche den verbrauchten Kubikzentimetern Hydroxylaminlösung entspricht. Bei der Umrechnung auf Prozente Traubenzucker ist dann selbstverständlich die angewandte Verdünnung des Harns zu berücksichtigen. — Der Tabelle liegt das empirisch gefundene Verhältnis zwischen Bang'scher Lösung und Traubenzucker zu Grunde, daß nämlich 50 ccm blaue Bang'sche Lösung 60 mg Traubenzucker entsprechen. Der zu untersuchende Harn darf also in 10 ccm nicht mehr als 60 mg Traubenzucker enthalten, andernfalls muß man für die Bestimmung weniger als 10 ccm Harn verwenden oder den Harn vorher entsprechend verdünnen.

Hydr. Lsg. ccm	mg $C_6H_{12}O_6$	Hydr. Lsg. ccm	mg $C_6H_{12}O_6$	Hydr. Lsg. ccm	mg $C_6H_{12}O_6$	Hydr. Lsg. ccm	mg $C_6H_{12}O_6$
44	4,9	33	15,4	21	29,0	10	43,3
43	5,8	32	16,5	20	30,2	9	44,7
42	6,7	31	17,5	19	31,4	8	46,3
41	7,6	30	18,6	18	32,6	7	48,0
40	8,5	29	19,6	17	33,9	6	49,8
39	9,4	28	20,7	16	35,1	5	51,6
38	10,4	27	21,8	15	36,4	4	53,4
37	11,4	26	22,9	14	37,7	3	55,0
36	12,4	25	24,1	13	39,0	2	57,3
35	13,4	24	25,2	12	40,4	1	59,4
34	14,4	23	26,5	11	41,8		
		22	27,7				

Bemerkungen. Jessen-Hansen[1]) hat gefunden, daß der Endpunkt der Titration, und somit auch der Verbrauch an Hydroxylaminlösung, von den folgenden Umständen abhängig ist:

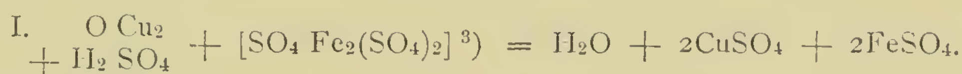
1. Von der Schnelligkeit des Zuflusses der Hydroxylaminlösung zum Harn-Kupfersalzgemisch. Die Schnelligkeit des Zuflusses kann unter Umständen einen derartigen Einfluß ausüben, daß im Verbrauche der Hydroxylaminlösung Differenzen bis zu 1,7 ccm vorkommen können. — 2. Von der Temperatur, bei der man die Titration ausführt. Bei einer Temperaturdifferenz von nur 24° kann im Verbrauche der Hydroxylaminlösung ein Unterschied von 2 ccm vorkommen. — 3. Von dem Volumen der Flüssigkeit. — Jessen-Hansen kommt auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu dem Schlusse, daß eine Aenderung der Versuchsbedingungen bei der Bestimmung des Traubenzuckers nach Bang einen nicht unerheblichen Unterschied in den Resultaten bedingen kann. — Hierzu kommt noch die Schwierigkeit, das Ende der Titration mit der Hydroxylaminlösung

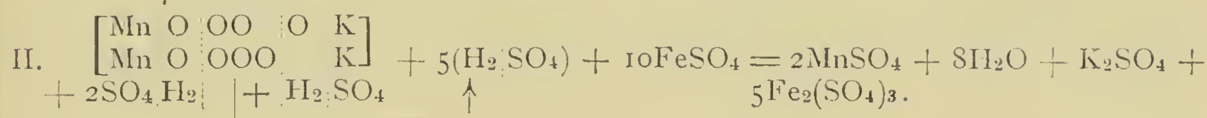
[1]) Biochemische Zeitschrift Bd. 10, 247 (1908).

richtig zu erkennen, worauf W. Autenrieth und Th. Tesdorpf[1]) zuerst hingewiesen haben. Andererseits muß freilich in Betracht gezogen werden, daß die von Aenderungen der Versuchsbedingungen hervorgerufenen Aenderungen der Resultate nicht von einer solchen Größenordnung sind, als daß sie die Bang'sche Methode völlig unbrauchbar machen. Nur darf man sie nicht außer acht lassen.

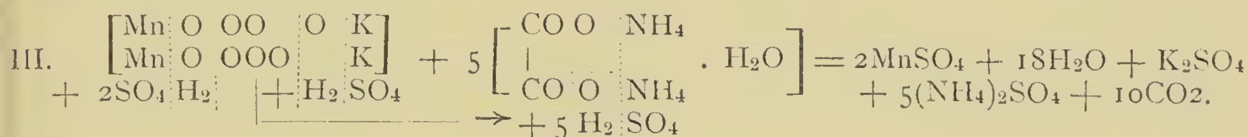
5. Die Bestimmung des Traubenzuckers nach G. Bertrand[2]).

Auch die Bertrand'sche Methode der Bestimmung des Traubenzuckers gehört zu den Kupfermethoden. Nach ihr wird das beim Kochen des zuckerhaltigen Harns mit überschüssiger Fehling'scher Lösung gebildete Kupferoxydul nach dem Abfiltrieren und Auswaschen in einer Lösung von Ferrisulfat in Schwefelsäure gelöst und das neben Kupfersulfat in Lösung gegangene Ferrosulfat mit einer eingestellten, etwa $^1/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung, titriert:





Die Titerstellung der annähernd $^1/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung führt Bertrand mit reinem Ammoniumoxalat $C_2O_4(NH_4)_2 \cdot H_2O$ (Mol. Gew. 142,1) aus:



Nach Gleichung I entsprechen 2 Atome Eisen 2 Atomen Kupfer. Nach Gleichungen II und III verbrauchen 10 Atome Eisen und 5 Moleküle Ammoniumoxalat, also auch 2 At. Eisen und 1 Mol. des Oxalats, die gleiche Menge Kaliumpermanganat zu ihrer Oxydation in schwefelsaurer Lösung. Da 2 At. Eisen auch 2 At. Kupfer entsprechen, so entspricht demnach auch 1 Mol. Ammoniumoxalat (142,1) 2 At. Kupfer = $2 \times 63{,}6 = 127{,}2$ Cu oder die Menge Kaliumpermanganatlösung, welche 1 g Ammoniumoxalat oxydieren kann, entspricht somit nach Gleichung

$$142{,}1 : 127{,}2 = 1 : x \quad (x = 0{,}8951)$$

0,8951 g Kupfer.

Erfordernisse. 1. Kupfersulfatlösung. 40 g reines kristallisiertes Kupfersulfat werden in Wasser zu 1 Liter gelöst. — 2. Alkalische Seignettesalzlösung. 200 g reines Seignettesalz und 150 g Aetznatron werden in Wasser zu 1 Liter gelöst. — 3. Lösung von Ferrisulfat in Schwefelsäure. 50 g Ferrisulfat werden in 200 ccm reiner konz. Schwefelsäure gelöst, dann wird die Lösung mit Wasser auf 1 Liter verdünnt. Diese Lösung muß frei von Ferrosulfat und anderen reduzierend wirkenden Stoffen sein; sie

---

[1]) Münchener medizinische Wochenschrift 1910, Nr. 34.

[2]) Bulletin soc. chim. Paris [3] 35, 1285 (1906).

[3]) Ferrisulfat $Fe_2(SO_4)_3$ kann geschrieben werden $[SO_4Fe_2(SO_4)_2]$.

darf also die Kaliumpermanganatlösung nicht entfärben. 4. Kaliumpermanganatlösung, welche im Liter 5 g $KMnO_4$ enthält.

Titerstellung der Kaliumpermanganatlösung. Man löst 0,25 g genau abgewogenes Ammoniumoxalat $C_2O_4(NH_4)_2.H_2O$ in 50 ccm Wasser auf, fügt 2 ccm reine konz. Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf 60—80° und läßt zu der heißen Lösung unter Umschütteln aus einer Bürette die Kaliumpermanganatlösung bis gerade zur bleibenden schwachen Rotfärbung zufließen. Es werden zu 0,25 g Ammoniumoxalat etwa 22 ccm der Kaliumpermanganatlösung verbraucht. Durch Multiplikation der abgewogenen 0,25 g Ammoniumoxalat mit 0,8951 (s. oben) = 0,2238 erfährt man die entsprechende Menge Kupfer. Werden z. B. bei der Titerstellung auf 0,25 g Ammoniumoxalat 22,2 ccm der Kaliumpermanganatlösung verbraucht, so entsprechen die letzteren somit 0,2238 g Kupfer, oder 1 ccm der Kaliumpermanganatlösung entspricht 0,2238 : 22,2 = 0,010081 g = 10,081 mgCu.

Ausführung. Der Harn muß wie für alle Kupfermethoden, falls er zuckerreicher ist, so verdünnt werden, daß er nicht mehr als 0,5% Traubenzucker enthält. Man bringt 20 ccm des, eventuell vorher entsprechend verdünnten Harns in einen Erlenmeyerkolben von etwa 150 ccm Inhalt, fügt je 20 ccm der Kupfersulfat- und alkalischen Seignettesalzlösung hinzu, erhitzt zum Sieden und hält genau 3 Minuten in nicht zu heftigem Kochen. Dann läßt man das ausgeschiedene Kupferoxydul absitzen, bringt hierauf die Flüssigkeit, die durch ihren Gehalt an überschüssiger Kupferlösung blau gefärbt erscheinen muß — andernfalls ist ein neuer Versuch mit stärker verdünntem Harn anzusetzen — in ein Asbeströhrchen oder einen Goochtiegel und saugt gut ab. Man achte hierbei darauf, daß möglichst wenig Niederschlag aufs Asbestfilter gelangt. Nun schüttelt man den Niederschlag im Erlenmeyerkölbchen mit warmem Wasser an und gießt auch dieses nach dem Absetzenlassen durchs Asbestfilter. Man löst nun den ausgewaschenen Kupferoxydulniederschlag im Erlenmeyerkolben in 20 bis 25 ccm der Ferrisulfatlösung (3), und zwar ohne zu erwärmen[1]), und gießt die Lösung durchs Asbestfilter, um die auf diesem befindlichen, meist geringen Mengen von Kupferoxydul zu lösen, spült mit kaltem Wasser nach und bestimmt im erhaltenen Filtrate das in Lösung befindliche Ferrosulfat sofort und möglichst rasch mit der Kaliumpermanganatlösung, deren Titer man vorher mit reinem Ammoniumoxalat ermittelt und auf Kupfer umgerechnet hat (s. oben). Die Endreaktion ist da, wenn die grüne Farbe der ursprünglichen Lösung in rosa übergegangen ist. Dieser Farbenwechsel ist durchaus scharf und läßt sich auch bei künstlichem Lichte noch gut erkennen.

Berechnung. Wie unter Titerstellung der Kaliumpermanganatlösung angegeben ist, rechnet man zunächst die Anzahl Milligramme Kupfer aus, welche den verbrauchten Kubikzentimetern der Permanganatlösung entsprechen; dann erfährt man aus der untenstehenden Tabelle die entsprechende, ebenfalls in Milligrammen ausgedrückte Menge an Traubenzucker.

[1]) Weil sonst das Ferrosulfat der Lösung durch den Luftsauerstoff oxydiert werden würde.

Bemerkungen. Falls man über die fertigen Lösungen verfügt, ist eine Bestimmung des Traubenzuckers nach Bertrand in 15 bis 20 Minuten beendigt; sie gibt zuverlässige Werte, wenn man die Lösung des Kupferoxyduls in der Ferrisulfatlösung sofort nach ihrer Herstellung titriert. — Funk [1]) weist mit Recht darauf hin, daß bei dem Bertrand'schen Verfahren nur das durch die Glukosewirkung entstandene und als Niederschlag erhaltene Kupferoxydul bestimmt wird, nicht aber dasjenige Oxydul, welches durch andere, ebenfalls reduzierend wirkende normale Bestandteile des Harns gebildet, aber in Lösung gehalten wird.

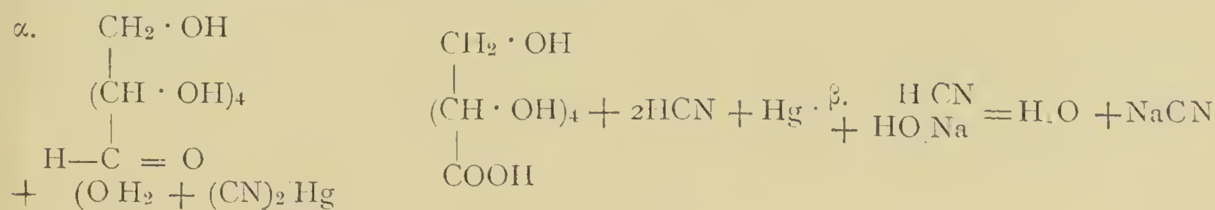
Tabelle.

Cu in mg	d-Glukose in mg	Cu in mg	d-Glukose in mg	Cu in mg	d-Glukose in mg	Cu in mg	d-Glukose in mg	Cu in mg	d-Glukose in mg
20,4	10	57,2	29	91,8	48	124,7	67	154,0	85
22,4	11	59,1	30	93,6	49	126,4	68	155,6	86
24,3	12	60,9	31	95,4	50	128,1	69	157,2	87
26,3	13	62,8	32	97,1	51	129,8	70	158,8	88
28,3	14	64,6	33	98,9	52	131,4	71	160,4	89
30,2	15	66,5	34	100,6	53	133,1	72	162,0	90
32,2	16	68,3	35	102,3	54	134,7	73	163,6	91
34,2	17	70,1	36	104,1	55	136,3	74	165,2	92
36,2	18	72,0	37	105,8	56	137,9	75	166,7	93
38,1	19	73,8	38	107,6	57	139,6	76	168,3	94
40,1	20	75,7	39	109,3	58	141,2	77	169,9	95
42,0	21	77,5	40	111,1	59	142,8	78	171,5	96
43,9	22	79,3	41	112,8	60	144,5	79	173,1	97
45,8	23	81,1	42	114,5	61	146,1	80	174,6	98
47,7	24	82,9	43	116,2	62	147,7	81	176,2	99
49,6	25	84,7	44	117,9	63	149,3	82	177,8	100
51,5	26	86,4	45	119,6	64	150,9	83		
53,4	27	88,2	46	121,3	65	152,5	84		
55,3	28	90,0	47	123,0	66				

Die Quecksilbermethoden.

6. Die Bestimmung des Traubenzuckers nach K. Knapp [2]).

Die Methode der Bestimmung des Traubenzuckers von Knapp beruht auf der Eigenschaft dieses Zuckers, Quecksilbercyanid in alkalischer Lösung zu metallischem Quecksilber zu reduzieren, während der Zucker selbst zu Glukonsäure und anderen Substanzen wie Zuckersäure oxydiert wird (s. oben).



[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 507 (1908).

[2]) Ann. der Chem. und Pharm. 154, 252 (1854).

Der Endpunkt der Reaktion ist erreicht, wenn alles Quecksilber einer abgemessenen Menge Knapp'scher Lösung ausgefällt ist, und zwar wird er mit Hilfe einer alkalischen Zinnoxydullösung oder, nach dem Ansäuern mit Essigsäure, mit Schwefelwasserstoff erkannt.

Erfordernisse. 1. Alkalische Quecksilbercyanidlösung. Man löst 10 g reines, vorher im Vacuum über Schwefelsäure oder im Dampftrockenschranke ausgetrocknetes Quecksilbercyanid, $Hg(CN)_2$, in 100 ccm Natronlauge vom spez. Gew. 1,145 (= Lauge mit ca. 13,5 g NaOH) und verdünnt die Lösung mit Wasser auf 1 Liter.

Die Knapp'sche Lösung kann längere Zeit aufbewahrt werden, ohne Zersetzung zu erleiden; zweckmäßigerweise ermittelt man den Titer der Lösung mit einer 0,5%igen Lösung von reinem Traubenzucker, der vor dem Abwägen 1/4 Stunde bei 100—110° auszutrocknen ist.

2. Alkalische Zinnoxydullösung. Man löst 50 g kristallisiertes Zinnchlorür ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) in 10%iger Natronlauge und verdünnt die Lösung mit Wasser zum Liter. Man bringt in die Lösung granuliertes Zinn, weil sie sonst schon durch den Luftsauerstoff leicht oxydiert und infolge dessen unbrauchbar wird.

Ausführung. Wie bei anderen Zuckerbestimmungsmethoden darf auch bei der Methode von Knapp der Traubenzuckergehalt des Harns höchstens 0,5 bis 0,6% betragen; bei einem höheren Zuckergehalt muß der betreffende Harn vor der Titration auf das Fünf-, Zehnfache oder noch stärker verdünnt werden. — Vorhandenes Eiweiß muß durch Aufkochen des Harns in schwach essigsaurer Lösung, Abfiltrieren und Auffüllen nach dem Erkalten auf das ursprüngliche Volumen erst vollständig entfernt werden.

Man läßt aus einer Bürette[1]) 20 ccm Knapp'sche Lösung in eine Kochflasche aus Jenaer Glas fließen, fügt 80 ccm Wasser — bei einem Zuckergehalt unter 0,5% nur 40—60 ccm — hinzu und erhitzt zum Sieden. Den vorher entsprechend verdünnten Harn läßt man ebenfalls aus einer Bürette nach und nach, anfangs von 1 zu 1 ccm, dann von 0,5 zu 0,5 und schließlich von 0,1 zu 0,1 ccm zu der kochend heißen verdünnten Knapp'schen Lösung fließen, indem man nach jedem Zusatz 1/2 bis 1 Minute in gelindem Sieden erhält. Nähert man sich dem Ende der Reaktion, so beginnt die Flüssigkeit klar zu werden, indem sich das reduzierte Quecksilber samt den Phosphaten des Harns rasch absetzt. Nun bringt man auf eine Porzellanplatte oder flache Porzellanschale oder auch eine Glasplatte, die ein Stück Filtrierpapier als Unterlage hat, mit einem Glasstabe einen Tropfen des geklärten Harngemisches und läßt dazu aus einer Pipette einen Tropfen der alkalischen Zinnoxydullösung fließen. Enthält das Gemisch noch Quecksilbercyanid in Lösung, so färbt sich der einfallende Tropfen durch ausgeschiedenes Quecksilber grau. Man muß also solange mit dem

---

[1]) Man sauge die stark ätzend und außerordentlich giftig wirkende alkalische Quecksilbercyanidlösung ja nicht in einer Pipette mit dem Munde auf!

Zusatze des Harns zur Knapp'schen Lösung fortfahren, bis diese Probe negativ ausfällt. Die erste Bestimmung kann nur als ein Vorversuch angesehen werden; man führe noch mindestens zwei Bestimmungen aus, bei welchen das ganze oder nahezu ganze Harnvolumen, welches zur Ausfällung von 20 ccm Knapp'scher Lösung erforderlich ist, auf einmal zugesetzt wird, bis man zwei nur um 0,1 ccm des verdünnten Harns unterschiedene Bestimmungen hat, von welchen die eine Probe noch eine Spur Quecksilber gelöst enthält, die andere aber keins mehr. Als wahren Wert legt man dann der Berechnung das Mittel aus diesen beiden letzten Bestimmungen zu Grunde.

Berechnung. Prüft man in der angegebenen Weise mit Zinnoxydulnatron auf noch in Lösung befindliches Quecksilber, so ergibt sich auf Grund der von »Soxhlet« seinerzeit ausgeführten Untersuchungen, daß 100 ccm Knapp'sche Lösung durch 0,200 g wasserfreien Traubenzucker reduziert werden. 20 ccm »Knapp« zeigen somit 0,04 g Traubenzucker an. Diese Menge Traubenzucker ist also in der bei der Titration verbrauchten Menge des verdünnten Harns enthalten. Bei der Umrechnung auf Prozente muß selbstverständlich die Verdünnung des Harns berücksichtigt werden.

Bemerkungen. Die Titrierung des Traubenzuckers im Harn nach Knapp ist leicht auszuführen und liefert auch recht brauchbare Resultate. Sie kann sowohl bei Tageslicht wie bei künstlicher Beleuchtung ausgeführt werden. Wie die Fehling'sche Titriermethode liefert auch die Quecksilbermethode nach Knapp einen etwas zu hohen Traubenzuckerwert, weil ja der Harn normalerweise Substanzen enthält, welche gerade so wie Traubenzucker die Quecksilberlösung reduzieren. Zu diesen normalen Harnbestandteilen gehört das Kreatinin, welches beim Erwärmen eine alkalische Quecksilbercyanidlösung reduziert. (C. Arnold[1]), und zwar scheidet es etwa um die Hälfte mehr Quecksilber aus den betreffenden Lösungen ab als die gleiche Gewichtsmenge Traubenzucker. Die bei gemischter Kost vom Erwachsenen ausgeschiedene tägliche Kreatininmenge von 1,8 bis 2,1 g würde demnach 2,7 bis 3,2 g Traubenzucker vortäuschen können. Will man also einen richtigen Traubenzuckerwert für einen zuckerhaltigen Harn erhalten, so muß man den Zucker mit Hefe vergähren lassen, dann die nach der Gährung noch vorhandenen reduzierend wirkenden Stoffe für sich bestimmen, die Reduktion derselben als Traubenzucker ausrechnen und den hierbei erhaltenen Wert von dem ursprünglich erhaltenen Zuckerwert in Abzug bringen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß es sich nicht gleich bleibt, in welcher Weise die Endreaktion bei der Titration mit Knapp'scher Lösung ermittelt wird. Die Resultate fallen durchaus verschieden aus, je nachdem man die Probe auf noch in Lösung befindliches Quecksilbercyanid mit Schwefelammonium vornimmt, oder, nach dem Ansäuern mit Essigsäure, mit Schwefelwasserstoffwasser, oder mit alkalischer Zinnoxydullösung. Prüft man mit der letzteren, so zeigt nach Soxhlet's[2]) umfassenden Untersuchungen 1 ccm Knapp 2,00 bis 2,02 mg Traubenzucker an.

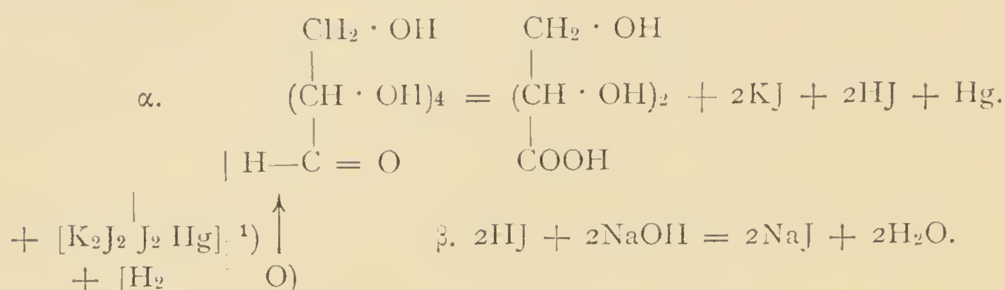
7. Die Bestimmung des Traubenzuckers nach Sachsse.

Für diese Bestimmung verwendet man eine mit Kalilauge versetzte

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 39, 1227 (1909).

[2]) Journ. f. prakt. Chemie (2) 21, 300 (1880).

Lösung von Quecksilberjodid in Jodkaliumlösung, aus welcher Traubenzucker in der Siedehitze metallisches Quecksilber reduziert. Der Zucker selbst wird zu Glukonsäure, Zuckersäure und den anderen, früher erwähnten Substanzen oxydiert. Der Endpunkt der Reaktion wird wie bei der Knapp'schen Methode mit Hilfe einer alkalischen Zinnoxydullösung erkannt.



Erfordernisse. 1. Quecksilberlösung. Man löst 18 g im Vacuum über Schwefelsäure ausgetrocknetes Quecksilberjodid (HgJ_2), 25 g Jodkalium und 10 g Aetzkali in etwa 200 ccm Wasser auf und verdünnt diese Lösung mit Wasser zu 1 Liter. 2. Alkalische Zinnoxydullösung. Eine Lösung von 50 g kristallisiertem Zinnchlorür in Natronlauge wird mit Wasser zum Liter verdünnt.

Ausführung. Die Bestimmung des Traubenzuckers mit Hilfe der Sachsse'schen Lösung wird in der für die Knapp'sche Methode angegebenen Weise ausgeführt. Der betreffende Harn soll nur 0,5 bis höchstens 1% Traubenzucker enthalten und muß eiweißfrei sein, andernfalls ist er zu verdünnen und muß in der üblichen Weise vor der Titration von Eiweiß befreit werden. Zweckmäßig stellt man die Sachsse'sche Lösung auf chemisch reinen, vor dem Abwägen bei 100 bis 110⁰ ausgetrockneten Traubenzucker ein, und zwar mit einer 0,5%igen Lösung. Die Endreaktion wird, wie bereits oben bemerkt ist, mit der alkalischen Zinnoxydullösung erkannt, welche mit einer Spur Sachsse'scher Lösung einen braunen Niederschlag gibt. Man arbeite hierbei in der für die Knapp'sche Methode angegebenen Weise.

Nach Soxhlet entspricht 1 ccm »Sachsse« 3,25 mg Traubenzucker in 0,5%iger Lösung und 3,3 mg in 1%iger Lösung.

8. Die Bestimmung des Traubenzuckers durch Polarisation.

Der Traubenzucker dreht in Lösung die Ebene des polarisierten Lichtstrahles nach rechts. Die spezifische Drehung des Traubenzuckers $[\alpha]_D$ gibt die Zahl an, um welchen Winkel eine 1 Dezimeter dicke Schicht einer Traubenzuckerlösung die Ebene des polarisierten Lichtstrahles nach rechts ablenkt, wenn 100 ccm der Lösung 100 g Traubenzucker enthielten; sie beträgt für die Natriumlinie D, also $[\alpha]_D = + 52{,}5^0$ (= 100% Traubenzucker). Beim Harn darf man, ohne einen erheblichen Fehler zu machen, 100 ccm = 100 g setzen. Die zur Aufnahme des Harns dienenden Beobachtungsrohre der Polarisationsapparate

¹) Quecksilberjodidjodkalium $[HgJ_4]K_2$ kann geschrieben werden $[K_2J_2\ J_2Hg]$.

sind 1,2 oder 3 Dezimeter lang. Nimmt man die Bestimmung in einem Rohre von anderer Länge als von 1 Dezimeter vor, so muß der am Apparate abgelesene Drehungswinkel oder schließlich die ausgerechnete Traubenzuckermenge durch die Länge des Beobachtungsrohrs, also durch 2 oder 3. dividiert werden. Der zu polarisierende Harn muß in erster Linie vollkommen klar sein, da trübe Harne unter Umständen mehr Licht wegnehmen und daher die Bestimmung unsicher machen, als selbst sehr gefärbte Harne. Zuckerharne können oft nach vorausgegangener Filtration direkt polarisiert werden. Ist durch einfache Filtration eine vollständige Klärung nicht zu erzielen, oder ist der betreffende Harn stark gefärbt, so schüttelt man ca. 50 ccm desselben mit 5 g fein gepulvertem Bleiacetat einige Minuten gründlich durch und filtriert dann das Gemisch durch ein trockenes Doppelfilterchen. In den allermeisten Fällen erhält man auf diese Weise ein vollkommen klares und farbloses oder fast farbloses Filtrat, das sich zum Polarisieren vorzüglich eignet. Bleiacetat fällt aus dem Harn Phosphorsäure, Schwefelsäure und Farbstoffe, aber keinen Traubenzucker aus. — Man kann auch eine Lösung von 25 g kristallisiertem Bleiacetat, $(C_2H_3O_2)_2Pb \cdot 3H_2O$, in 100 ccm Wasser vorrätig halten, jeweils 10 ccm dieser Lösung in einem Meßzylinder mit 50 ccm des zu untersuchenden Harns tüchtig umschütteln und dann die Mischung durch ein trockenes Doppelfilterchen gießen. Geht die Flüssigkeit trübe durchs Filter, so muß sie wiederholt aufs Filter zurückgegossen werden, bis ein absolut klares Filtrat erhalten wird. Beim Arbeiten mit der Bleiacetatlösung in dem angegebenen Mischungsverhältnisse mit Harn muß der erhaltene Wert noch mit $6/5 = 1,2$ multipliziert werden, um den richtigen Gehalt des Harns an Traubenzucker zu erfahren.

Beispiel. Ein in der angegebenen Weise behandelter Harn zeigt im 2-Dezimeterrohr eine Drehung von $1,25^0$; der nach der Proportion spez. Drehung : g $C_6H_{12}O_6$ in 100 ccm.

$$52,5 : 100 = 1,25 : x \quad (x = 2,381)$$

für $x = 2,381$ gefundene Zuckerwert muß durch 2 dividiert werden, weil die Beobachtung im 2-Dezimeterrohr vorgenommen wurde und muß mit 1,2 multipliziert werden, weil 50 ccm des ursprünglichen Harns mit 10 ccm der Bleiacetatlösung versetzt wurden. Somit enthält der untersuchte Harn $\frac{2,381 \times 1,2}{2} = 1,43\%$ Traubenzucker.

Bemerkungen. Patein und Dufau[1]) haben in neuerer Zeit statt des Bleiacetats das Mercurinitrat als ein Mittel empfohlen, um stickstoffhaltige und andere störende Stoffe aus zuckerhaltigen Flüssigkeiten, also auch aus Zuckerharn, zu entfernen. Quecksilberoxydsalz wird in neutraler oder saurer Lösung durch Traubenzucker nicht, oder im ersteren Falle wenigstens nicht merklich reduziert; ferner invertiert es die hydrolisierbaren Zuckerarten nicht derart, daß bei deren Bestimmung grobe Fehler entstehen könnten und beeinflußt endlich auch nicht deren Drehungsvermögen. Bereitung der Mercurinitratlösung.

[1]) Journ. de Pharm. et chim. [6] 15, 221 (1902) und ebenda 17, 5 (1903).

Man verteilt 220 g gelbes Quecksilberoxyd in 300—400 ccm Wasser, fügt erst die gerade zur Lösung erforderliche Menge Salpetersäure, dann tropfenweise Natronlauge hinzu und zwar bis zum Erscheinen eines gelben Niederschlags, verdünnt mit Wasser bis zum Liter und filtriert ab.

Ausführung im Harn. Man versetzt in einem 100 ccm-Meßkölbchen 50 ccm des zuckerhaltigen Harns erst mit 25 ccm der Mercurinitratlösung, dann tropfenweise bis zum Eintritt der gegen Lackmus neutralen Reaktion mit stark verdünnter Natronlauge, füllt mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt tüchtig durch und filtriert durch ein trockenes Doppelfilterchen ab. Von dem hierbei erhaltenen klaren und farblosen Filtrate wird die Rechtsdrehung bestimmt. Im Filtrat darf mit Natronlauge kein Niederschlag mehr entstehen; andernfalls können die Spuren von noch gelöstem Quecksilber mit Schwefelwasserstoff entfernt werden. Bei der Berechnung berücksichtige man die Verdünnung des Harns, daß nämlich 100 ccm Filtrat 50 ccm ursprünglichem Harn entsprechen.

C. Carrez[1]) empfiehlt zur Klärung und Entfärbung des Harns Zinkacetat in Verbindung mit Ferrocyankalium. Man versetzt 50 ccm Harn mit je 5 ccm von zwei Lösungen, von welchen die eine 150 g Ferrocyankalium, die andere 300 g Zinkacetat im Liter gelöst enthält, schüttelt um, gießt durch ein trockenes Filter, polarisiert das Filtrat und multipliziert den hierbei erhaltenen Wert mit 1,2, um den richtigen Gehalt des Harns an Traubenzucker zu erfahren. Der sich bildende Niederschlag reißt gleichzeitig eine ganze Reihe von Substanzen mit nieder, wie Blut, Eiweiß, Gallenfarbstoffe, Peptone, Methylenblau, aber keinen Traubenzucker.

Das von J. Bang und G. Bohmannsson[2]) empfohlene Verfahren, mit Hilfe von Blutkohle bei Gegenwart von 20 Prozent Salzsäure von 25 % HCl die normalerweise im Harne vorkommenden und reduzierend wirkenden Stoffe Harnsäure, Kreatinin und Urochrom zu entfernen, kann Verfasser nicht empfehlen, weil es zweifelsohne Blutkohlen gibt, die zum Teil recht erhebliche Mengen Traubenzucker zurückhalten können (W. Autenrieth und Th. Tesdorpf[3]), auch wenn Salzsäure zugegen ist.

Abwesenheit von anderen Substanzen, die ebenfalls optisch aktiv sind.

Die polarimetrische Bestimmung des Traubenzuckers gibt selbstverständlich nur dann einen richtigen Wert, wenn in dem betreffenden Harn außer Traubenzucker keine anderen rechtsdrehenden, aber auch keine linksdrehenden Substanzen vorhanden sind. Von den letzteren kommen für den Harn in Betracht: Eiweiß, β-Oxybuttersäure, deren linksdrehende Modifikation sich ja häufig im Harn der Diabetiker vorfindet, Laevulose und gepaarte Glukuronsäuren. Die letzteren sind nach Einnahme verschiedener Arzneimittel wie von Chloralhydrat, Campher, Menthol, Terpentinöl, unter Umständen in größerer Menge im Harne vorhanden. — β-Oxybuttersäure und die gepaarten Glukuronsäuren können in einem Harne vorhanden sein, wenn dieser nach der Hefegährung Linksdrehung zeigt. Man klärt den vergohrenen Harn mit Bleiacetat, filtriert und untersucht das klare Filtrat polarimetrisch.

---

[1]) Ann. chim. analyt. appl. 13, 97 (1908).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 454 (1909).

[3]) Münchener medizinische Wochenschrift 1910, Nr. 34.

9. Die Bestimmung des Traubenzuckers aus dem Unterschiede im spezifischen Gewicht vor und nach der Hefegährung.

Da durch die Hefegährung aus dem Traubenzucker neben dem gasförmigen Kohlendioxyd, das nur bis zu seiner Sättigung gelöst bleibt, eine spezifisch leichtere Substanz, nämlich Aethylalkohol, entsteht, so muß das spez. Gew. des Zuckerharns nach der Gährung kleiner sein als es vorher war. Dieses Zurückgehen des spez. Gew. muß proportional der Zuckerkonzentration verlaufen, so lange die anderen Substanzen, welche das spez. Gew. des Harns beeinflussen, in normaler Menge vorhanden sind. Man muß also die Differenz im spez. Gew. des Zuckerharns vor und nach der Hefegährung mit einem empirisch gefundenen Faktor multiplizieren, um die entsprechende Zuckermenge von 100 ccm Harn zu finden.

Gefundene Differenz im spez. Gew. × Faktor = Traubenzuckermenge von 100 ccm Harn. Hieraus folgt, daß man diesen Faktor findet, wenn die auf irgend eine andere Weise gefundene Traubenzuckermenge durch die ebenfalls durch den Versuch ermittelte Dichtedifferenz dividiert wird:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Traubenzuckermenge in 100 ccm Harn}}{\text{Gefundene Differenz im spez. Gew. vor und nach der Gährung.}}$$

Dieser Faktor beträgt nach W. Roberts[1]) 230. — Andere Forscher haben andere Faktoren angegeben, welche von dem Robertsschen Faktor zum Teil stark abweichen.

Das spez. Gew. des Harns muß selbstverständlich bei der gleichen Temperatur sowohl vor als nach der Gährung bestimmt werden, und zwar mit Hilfe eines Pyknometers oder eines empfindlichen Araeometers, welches das spez. Gew. bis auf die vierte Stelle hinter dem Komma abzulesen gestattet. Das spez. Gew. muß, wenn irgend möglich, von dem frisch gelassenen Harn bestimmt werden. Längeres Stehenlassen vor der Bestimmung ist nicht zulässig, weil der Zuckerharn hierbei schon von selbst in Gährung übergehen kann.

Ausführung. Man schüttelt etwa 200 ccm des betreffenden Harns, von welchem das spez. Gew. bereits bestimmt wurde, mit ca. 1 g wirksamer Preßhefe in einem höchstens zur Hälfte angefüllten Kolben, verschließt diesen mit einem durchlochten Korkstopfen, durch dessen Oeffnung eine zu einer feineren offenen Spitze ausgezogene Glasröhre geht und läßt nun dieses Harn-Hefegemisch bei 24—34^0 stehen. Je nach der Temperatur ist der Traubenzucker in 10—24 Stunden vollständig vergohren, wovon man sich durch die Wismut- oder Trommer'sche Probe überzeugt. In der Wärme vergährt der Zucker schneller als bei Zimmertemperatur, am raschesten bei 34^0. Nach beendeter Vergährung gießt man den Harn durch ein trockenes Filter, bringt das Filtrat auf die Temperatur, bei welcher das spez. Gew. des Harns vor der Gährung ermittelt wurde, und bestimmt nun das spez. Gew. des-

[1]) Edinburgh med. Journ. 1861, 326 und The Lancet 1, 21 (1862).

selben in gleicher Weise wie das erstemal. Dieses Verfahren gibt durchaus befriedigende, für die Praxis hinreichend genaue Resultate, wenn der Harn mehr als 0,5 % Traubenzucker enthält.

Beispiel. Spez. Gew. des Harns vor der Hefegärung: 1,034
» » » » nach » » : 1,011
Differenz im spez. Gew.: 0,024

Somit enthält der untersuchte Harn 230 × 0,024 = 5,52 % Traubenzucker.

Bemerkungen. Lohnstein [1]) hat gefunden, daß der Faktor bei einem Zuckergehalt des Harns von 0 bis 10 %, bei einer Dichte des zuckerfreien Harns von 1,010 bis 1,030 und bei einer Temperatur von 15 bis 25° zwischen 223—244 schwankt. Rechnet man somit für alle Fälle mit dem Faktor 234, wobei der Harn für die Bestimmung des spez. Gew. nach der Gährung nicht filtriert wird, so macht man für die Bestimmung des Traubenzuckers höchstens einen Fehler von 5 % absolut; also bei einem Zuckergehalt des Harns von 4 % beträgt der absolute Fehler höchstens 0,2 Proz.

Der zu vergährende Harn muß schwach sauer reagieren; andernfalls muß er mit Weinsäure schwach angesäuert werden.

10. Die Bestimmung des Traubenzuckers mit dem Lohnsteinschen Gährungssaccharometer [2]).

Man läßt eine verhältnismäßig kleine Menge des zuckerhaltigen Harns mit Hefe über Quecksilber vergähren und zwar so, daß das sich entwickelnde Kohlendioxyd nicht entweichen kann und infolgedessen einen entsprechenden Druck auf das Quecksilber ausübt, das dann in dem offenen Schenkel des Apparates in die Höhe getrieben wird. Dieser Schenkel ist in seinem unteren Teile eng, in seinem oberen weiter, so daß das Gährungssaccharometer für zuckerarme und auch zuckerreichere Harne verwandt werden kann. Bei der geringen Harnmenge und der dünnen Schicht, wie der Harn zur Anwendung kommt, ist die vom Harn absorbierte Kohlensäuremenge außerordentlich gering, zudem dürfte eine Uebersättigung mit Kohlensäure ausgeschlossen sein. Auf das Skalenrohr wird eine Skala aufgesetzt, an der man nach beendeter Gährung den Gehalt des in Untersuchung genommenen Harns an Traubenzucker direkt ablesen kann. Das Lohnstein'sche Präzisions-Gärungssaccharometer (Fig. 4) liefert zuverlässige Werte, die mit den nach anderen Verfahren ermittelten Zuckerwerten gut übereinstimmen.

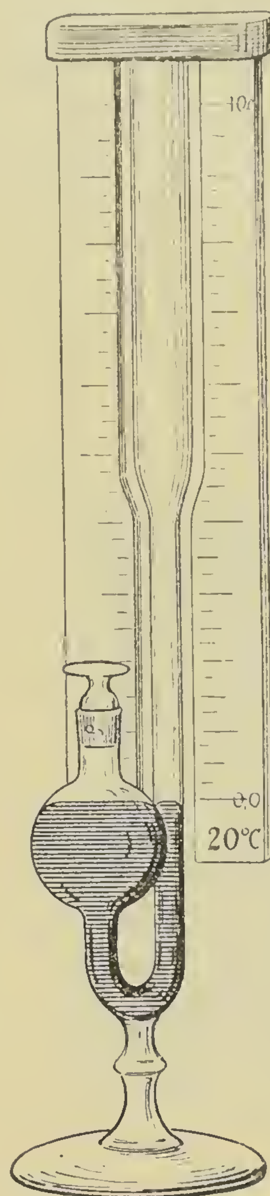
Ausführung. Man gießt die dem Apparate beigegebene, gerade richtige Menge Quecksilber in den vorher gut gereinigten und trockenen Apparat, bringt dann mit Hilfe einer ebenfalls beigegebenen Pravaz-Spritze 0,5 ccm des zu untersuchenden Harns in den kugelig erweiterten Teil des Apparates über das Quecksilber, fügt mit der gleichen Spritze 0,1 bis 0,2 ccm (nicht mehr) eines kurz vorher bereiteten dünnen Hefe-

[1]) Pflügers Archiv 62, 82 (1895).

[2]) Münchener mediz. Wochenschrift 1899, 1671. Der Apparat mit Gebrauchsanweisung kann von H. Noffke u. Cie., Berlin SW. 47 bezogen werden. Preis 12 Mark.

b r e i s hinzu und setzt den gut eingefetteten Stöpsel so auf, daß die seitliche Oeffnung im Halse des Apparates mit der im Stöpsel angebrachten Oeffnung korrespondiert. Auf diese Weise wird ein Ueberdruck beim Schließen des Apparates mit dem Stöpsel vermieden. Dann wird auf den Stöpsel ein beigegebenes Gewicht gelegt, um zu verhüten, daß dieser bei dem auftretenden Ueberdruck nicht herausgeschleudert wird; ferner setzt man auf den längeren Schenkel des Apparates die auf einem Brettchen befestigte Skala. Das Niveau des Quecksilbers in dem langen Schenkel soll mit der N u l l i n i e der Skala zusammenfallen. Sehr kleine Differenzen zwischen Quecksilberniveau und der Nullinie kann man schließlich beim endgültigen Ablesen des Zuckergehaltes an der Skala berücksichtigen. Schließlich dreht man den Stöpsel so, daß die beiden, in Frage kommenden Oeffnungen von Stöpsel und Hals des Kugelgefäßes nicht mehr korrespondieren. Man läßt nun den so vorbereiteten Apparat bei Zimmertemperatur von 15—18⁰ mindestens 24 Stunden, bei 32—38⁰ 4—5 Stunden stehen und liest dann den Stand des Quecksilbers im langen Schenkel an der Skala mit dem entsprechenden Zuckergehalt ab. Man überzeuge sich durch w i e d e r h o l t e s Ablesen, etwa alle 2 Stunden, daß die Quecksilbersäule nicht weiter ansteigt. Auch die Temperatur der den Apparat umgebenden Luft muß bestimmt werden, da die Zuckerwerte für zwei verschiedene Temperaturen auf der Skala angegeben sind.

Fig. 4.



B e m e r k u n g e n. Man bereitet den für den Gährungsversuch nötigen Hefebrei durch Verreiben von Preßhefe mit der 3 bis 4 fachen Menge Wasser. Für zuckerärmere Harne benutzt man einen dünneren Hefebrei, bereitet aus 1 Tl. Hefe mit 10 bis 15 Tln. Wasser.

Nach J o d l b a u e r s umfassenden Versuchen liegt das Temperaturoptimum der alkoholischen Gährung bei 34⁰ C. Mit frischer, höchstens einen Tag alter Hefe vollzieht sich die Gährung am besten; alte Hefe liefert zu wenig Kohlensäure, und zwar umso weniger je älter die Hefe ist. Die richtige Menge Kohlensäure erhält man nur dann, wenn man auf 1 Tl. Traubenzucker nicht mehr als $^1/_2$ Tl. frische, teigförmige Hefe verwendet. Bei einem U e b e r s c h u s s e an Hefe beginnt, bevor aller Traubenzucker verbraucht ist, die mit Kohlensäureentwicklung verbundene S e l b s t g ä h r u n g der Hefe. Die Menge der gebildeten Kohlensäure fällt dann zu groß aus, und zwar umso größer, je länger die Hefe in der vergorenen Flüssigkeit bleibt. Dagegen kann die Gährdauer bei Verwendung von 1 Tl. Hefe auf 2 Tle. Zucker überschritten werden, ohne daß eine Ueberproduktion von Kohlensäure eintritt. — Die im H a r n vorkommenden Zuckerkonzentrationen sind solche, daß der Traubenzucker desselben gleichmäßig vergohren werden kann.

11. Die kolorimetrische Bestimmung des Traubenzuckers nach W. Autenrieth und Th. Tesdorpf[1]).

Nach dieser Methode wird der entsprechend verdünnte Harn mit einem Ueberschusse von Bang'scher Kupferlösung (siehe S. 113) gekocht und die nach dem Kochen noch vorhandene blaue Färbung mit Hilfe des Autenrieth-Koenigsberger'schen Kolorimeters[2]) kolorimetrisch bestimmt. Die Einrichtung dieses Kolorimeters ist aus den nebenan stehenden Abbildungen (Fig. 5, 6, 7) zu ersehen. Der Glaskeil ist

Autenrieth-Koenigsberger'sches Kolorimeter.

Fig. 5. Fig. 6. Fig. 7.

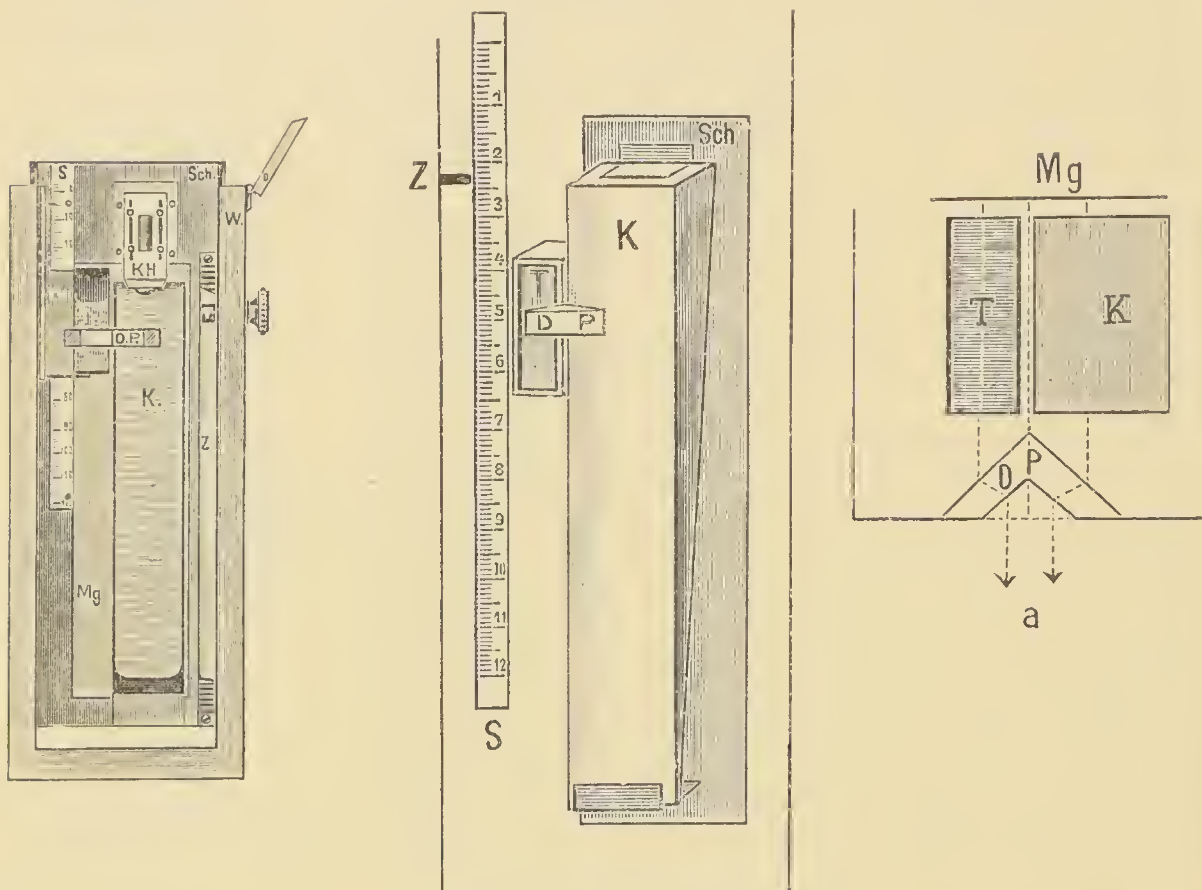


Fig. 5: Gesamtansicht. — Fig. 6: Teilansicht. Sch = Schieber mit Glaskeil K und Skala S; T = Trog oder Küvette, Z = Zeiger und DP = Helmholz'sche Doppelplatte. — Fig. 7: Gang der Lichtstrahlen: Mg = Milchglasplatte, K = Glaskeil mit der Standardlösung, T = Trog mit der kolorimetrisch zu untersuchenden Flüssigkeit, A = Auge.

mit der Vergleichslösung, der Standardlösung, gefüllt; er ist an einer Milchglasplatte befestigt und kann mit Hilfe eines Triebs verschoben werden. Der kleine Glastrog oder die Küvette des Apparates dient zur Aufnahme der Lösung, die kolometrisch untersucht werden soll. Ein wesentlicher Teil des Kolorimeters ist die Doppelplatte nach Helmholtz, wodurch erreicht wird, daß sich keine Trennungslinie, kein dunkler Zwischenraum,

[1]) Münchener medizinische Wochenschrift 1910 Nr. 34. Vgl. auch W. Autenrieth und Gerhard Müller, ebenda 1911 Nr. 17.

[2]) Dieses neue Kolorimeter kann von der Firma F. Hellige u. Cie. in Freiburg i. B. bezogen werden.

zwischen den beiden zu vergleichenden Flüssigkeitsschichten befindet, wie dies bei vielen anderen Kolorimetern der Fall ist; ist nämlich eine Trennungslinie vorhanden, so wird die Genauigkeit der Vergleichung mindestens auf die Hälfte, meist aber bis auf ein Drittel und weniger herabgesetzt. An der Milchglasplatte ist noch eine Skala und am Kolorimetergehäuse ein Zeiger angebracht, der anzeigt, um wieviel Skalenteile der Glaskeil verschoben werden muß, bis Farbengleichheit erreicht ist. An der vorderen Seite des Kolorimeters dicht vor der Helmholtz'schen Doppelplatte befindet sich das Beobachtungsfenster, nämlich ein schmaler Spalt. Ein Vorzug des Kolorimeters im Vergleiche zu vielen anderen ähnlichen Apparaten ist der, daß man beliebig konzentrierte Lösungen, wenigstens innerhalb bestimmter Konzentrationen, durch Verschieben des Glaskeiles direkt vergleichen kann. Dadurch fällt aber das lästige Verdünnen der einen Lösung bis zum Erreichen der Farbengleichheit, wodurch zudem leicht zu stark verdünnt wird, fort. Die kolorimetrischen Messungen sind in kurzer Zeit ausgeführt, indem eine jede kolorimetrische Messung nur etwa 2 Minuten Zeit beansprucht, vorausgesetzt freilich, daß man den »Zuckerkeil« bereits geeicht und auch die Eichungskurve konstruiert hat.

Erfordernisse für die kolorimetrische Traubenzuckerbestimmung. 1. Bang'sche Kupferlösung. Man löst 12,5 g reines kristallisiertes Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) in 75 ccm warmem Wasser auf, kühlt bis auf etwa 15° ab und gießt dann diese Lösung langsam und unter Umrühren in eine ebenfalls auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung von 250 g Kaliumkarbonat (K_2CO_3) 200 g Kaliumrhodanid (CNSK) und 50 g Kaliumbikarbonat ($KHCO_3$) in 600 ccm Wasser. Man verdünnt nun die Mischung auf 1 Liter, schüttelt um, läßt 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen und filtriert einen Niederschlag, der hierbei immer entsteht, ab. Die Bang'sche Lösung ist rein blau und muß vollkommen klar sein. Sollte sich beim Aufbewahren ein Niederschlag bilden, so muß er vor der Verwendung der Lösung zur kolorimetrischen Bestimmungen abfiltriert werden, denn nur absolut klare Lösungen können kolorimetrisch miteinander verglichen werden.

Beim Lösen der drei Kaliumsalze in 600 ccm Wasser erwärme man höchstens auf 50°, weil sonst bei höherer Temperatur, also über 50°, aus dem Kaliumbikarbonat, Kohlensäure frei wird. Die angegebenen Temperaturgrenzen dürfen daher nicht überschritten werden. — In einer Glasstöpselflasche an einem dunklen Orte aufbewahrt ist die Bangsche Kupferlösung längere Zeit unverändert haltbar.

2. Das Autenrieth-Koenigsberger'sche Kolorimeter mit einem gefüllten und bereits geeichten geschlossenen »Farbstoffkeil« oder mit einem offenen geeichten oder nicht geeichten Glaskeil, der vor jeder Zuckerbestimmung mit klarer Bang'scher Kupferlösung zu füllen ist. Es empfiehlt sich nicht, die Bang'sche Kupferlösung längere Zeit in den offenen Keilen stehen zu lassen, weil sonst die Wandungen der Glaskeile angeätzt, matt und infolgedessen für genauere kolorimetrische Bestimmungen unbrauchbar werden. Nach beendeter Bestimmung gieße man daher die Bang'sche Lösung aus dem Keile in die Standflasche zurück, spüle den Keil mit Wasser gut aus, evtl. auch mit Alkohol und Aether, und trockne schließlich den Keil[1]).

[1]) Die Firma F. Hellige dahier liefert für die kolorimetrischen Zuckerbe-

Die Eichung des »Zuckerkeils« und die Konstruktion der Zuckerkurve. Man verwendet für die Eichung des »Zuckerkeils« eine 0,5%ige wässerige Lösung von reinstem kristallisiertem Traubenzucker (Kahlbaum-Berlin), der vor dem Abwägen etwa 1/4 Stunde im Luftbade bei 110° auszutrocknen ist. Man bringt diese Traubenzuckerlösung in eine Bürette und destilliertes Wasser in eine zweite Bürette. Wechselnde Mengen der genau abzumessenden Traubenzuckerlösung werden jeweils mit Wasser zu 10 ccm ergänzt und in der folgenden Weise mit Bang'scher Lösung gekocht.

Man bringt 50 ccm, in einem Meßkölbchen abzumessende Bang'sche Kupferlösung in ein 150 bis 200 ccm fassendes Kochkölbchen aus Jenaer Glas, läßt aus der Bürette eine bestimmte Menge der 0,5% igen Traubenzuckerlösung, z. B. 6 ccm, und aus der anderen Bürette soviel Wasser zufließen, daß beide zusammen 10 ccm ausmachen, also für den angenommenen Fall 4 ccm Wasser, erhitzt dann das Gemisch auf einem Drahtnetze zum lebhaften Sieden, läßt genau 3 Minuten lang kochen, kühlt das Kölbchen unter der Wasserleitung rasch auf Zimmertemperatur ab, bringt seinen Inhalt unter wiederholtem Nachspülen mit wenig Wasser oder Rhodankaliumlösung in das Meßkölbchen zurück und füllt schließlich bis zur Marke auf. Nun schüttelt man um, füllt mit der so erhaltenen klaren, noch blau gefärbten Lösung den Glastrog des Kolorimeters und verschiebt den Keil bis zur Farbengleichheit. Wie bei allen kolorimetrischen Bestimmungen müssen auch bei dieser Bestimmung mehrere, nämlich 4 bis 6 Ablesungen vorgenommen werden, von welchen das arithmetische Mittel der Bestimmung zu Grunde gelegt wird. Auf diese Weise wurden 8 Punkte der unten aufgezeichneten Traubenzuckerkurve gefunden.

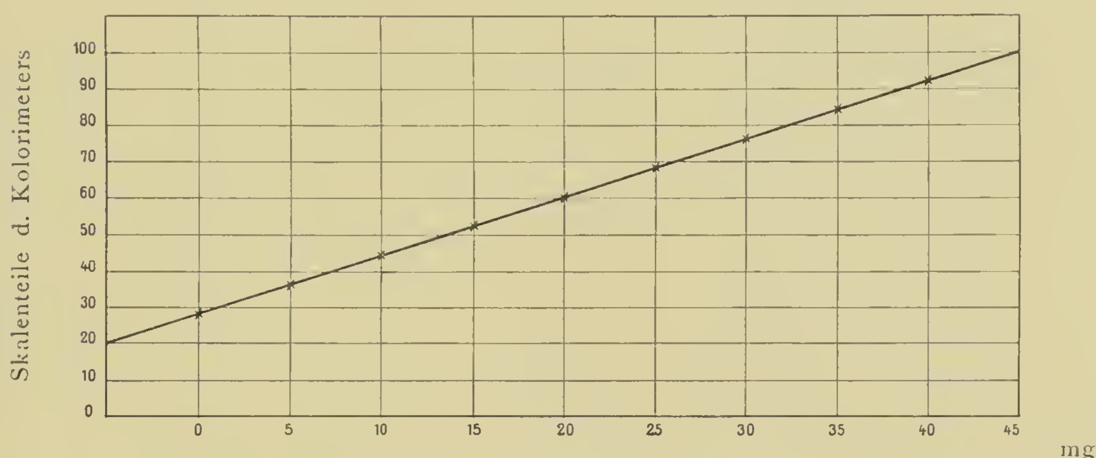
0,5% Traubenzuckerlösung.	Wasser.	10 ccm Lösung enthalten:	Farbengleichheit bei Skalenteil:
1 ccm	+ 9 ccm	5 mg Traubenzucker	36
2 »	+ 8 »	10 » »	44
3 »	+ 7 »	15 » »	52
4 »	+ 6 »	20 » »	60
5 »	+ 5 »	25 » »	67
6 »	+ 4 »	30 » »	76
7 »	+ 3 »	35 » »	84
8 »	+ 2 »	40 » »	92

stimmungen geeichte geschlossene Glaskeile, welche mit einer lichtbeständigen Farbstofflösung gefüllt sind. Für die Mehrzahl der Zuckerbestimmungen im Harne, besonders für praktische Zwecke, werden diese Farbstoffkeile geeignet sein. Nur bei manchen Zuckerkonzentrationen kann es vorkommen, daß eine vollkommene Farbengleichheit zwischen der kolorimetrisch zu untersuchenden Flüssigkeit in der Küvette und derjenigen im Glaskeile nicht vollkommen zu erreichen ist. In einem solchen Falle stellt man photometrisch, d. h. auf gleiche Helligkeit, ein, was auf 2 bis 3 Skalenteile, also mit genügender Genauigkeit, meist leicht erreicht werden kann. Für solche Untersuchungen, bei denen es auf größere Genauigkeit ankommt, können offene Glaskeile, welche mit der fertigen, mindestens 2 Tage alten Bangschen Kupferlösung zu füllen und selbst zu eichen sind, verwendet werden. Die Eichung der gefüllten Keile geschieht in der oben angegebenen Weise.

Zur Konstruktion der Zuckerkurve trägt man die jeweiligen Traubenzuckermengen, in Milligrammen ausgedrückt und bezogen auf die stets angewandten 10 ccm Lösung, auf die horizontale Abszissenaxe und die zugehörigen, am Kolorimeter abgelesenen Skalenteile auf die vertikale Ordinatenaxe eines Koordinatensystems ein. Verbindet man die jeweiligen Schnittpunkte, so stellt diese Verbindungslinie die Zuckerkurve dar. Auf diese Weise wurde durch Eintragen der oben verzeichneten acht Eichungswerte die unten abgebildete Zuckerkurve (Fig. 8) erhalten.

Traubenzuckerkurve.

Fig. 8.



Traubenzucker in 10 ccm Lösung oder verdünnten Harns.

Ausführung im Harn. Der Harn, in welchem der Zucker kolorimetrisch bestimmt werden soll, darf höchstens 0,4 Prozent Traubenzucker enthalten. Ein zuckerreicherer Harn muß also vorher entsprechend verdünnt werden. Einen Harn vom spez. Gew. 1,020 bis 1,030 verdünnt man mit Wasser auf das zehnfache, also man vermischt 1 Volumen Harn mit 9 Volumen Wasser, und einen Harn, der ein höheres spez. Gew. hat und voraussichtlich mehr als 4 Prozent Traubenzucker enthält, auf das fünfzehn- oder zwanzigfache. Bei Harnen mit einem Zuckergehalt bis 1% genügt eine Verdünnung auf das fünffache; man mische also in diesem Falle 1 Vol. Harn mit 4 Vol. Wasser.

Man bringt dann 50 ccm in einem Meßkölbchen abgemessene Bang'sche Lösung in ein Jenaer Kochkölbchen von 150 bis 200 ccm Inhalt, läßt 10 ccm des vorher entsprechend verdünnten Harns zufließen, erhitzt das Gemisch auf einem Drahtnetze (nicht einer Asbestplatte) zum Sieden, läßt 3 Minuten lang lebhaft kochen, kühlt das Kölbchen unter der Wasserleitung rasch auf Zimmertemperatur ab, bringt nun seinen Inhalt, unter wiederholtem Nachspülen des Kochkölbchens mit kleinen Mengen Wasser oder Rhodankaliumlösung, ohne Verlust in das Meßkölbchen zurück, füllt bis zur Marke auf und schüttelt gut um. Zur Entfernung von vorhandenem gelbem Farbstoff aus dem Harn fügt man 0,5 g feinste eisenfreie Blutkohle[1]) hinzu, schüttelt tüchtig durch, läßt

[1]) Eine von H. Flemming in Kalk a./Rh. bezogene äußerst feine

unter häufigem Umschütteln 5 Minuten lang stehen, filtriert alsdann einige ccm durch ein trockenes, doppeltes oder dreifaches Filter ab und füllt den Glastrog des Kolorimeters mit dem klaren, meist rein blauen Filtrat. Man verschiebt nun den »Zuckerkeil« des Kolorimeters bis zur Farbengleichheit, liest den zugehörigen Skalenteil ab und erfährt dann den diesem Skalenteile entsprechenden Traubenzuckerwert aus der Zuckerkurve. Die letztere gibt an, wieviel Milligramme Traubenzucker in den angewandten 10 ccm des eventuell vorher verdünnten Harns enthalten sind. — Die Resultate der kolorimetrischen Traubenzuckerbestimmungen fallen recht genau aus, da ein äußerst scharfes Ablesen am Kolorimeter auf 1 bis 2 Skalenteile möglich ist. Eine Differenz von einem Skalenteile in der Ablesung am Kolorimeter bedingt nur einen kleinen Fehler im Endresultat der Traubenzuckerbestimmung. Liest man z. B. das eine Mal bei Skalenteil 46 ab, und findet man bei einer Kontrollbestimmung Farbengleichheit bei Skalenteil 47, so entsprechen diese beiden Ablesungen nach der obigen Zuckerkurve 11,2 und 11,8 mg $C_6H_{12}O_6$ in 10 ccm des auf das zehnfache verdünnt gewesenen Harns, oder in 1 ccm des ursprünglichen Harns; der untersuchte Harn hat nach diesen beiden Ablesungen 1,12 oder 1,18 Prozent Traubenzucker enthalten. Selbst wenn man bei mehreren Ablesungen Farbengleichheit nur auf zwei Skalenteile finden sollte, ist die Differenz in den Zuckerwerten, welche diesen Ablesungen entsprechen, nur gering, denn man findet für den angenommenen Fall das eine Mal 1,12 das andere Mal 1,24 Prozent Traubenzucker.

Fruchtzucker.

Fruchtzucker, d-Fruktose oder Laevulose, $C_6H_{12}O_6$, ist ein Ketonzucker von der Konstitution $CH_2(OH) \cdot CH(OH) \cdot CH(OH) \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot CH_2OH$.

Stark zuckerhaltige Harne, welche mit Hefe vergähren, die Trommer'sche und Nylander'sche Probe geben und dabei starke Linksdrehung zeigen, ohne daß sie β-Oxybuttersäure enthielten, hat man wiederholt beobachtet. Nach Untersuchungen aus den letzten Jahren scheint die Annahme berechtigt zu sein, daß Fruchtzucker im Menschenharn vorkommen kann. Fruchtzucker gibt nahezu die gleichen Reaktionen wie der Traubenzucker: Alkalilaugen und die Lösungen der alkalischen Erden färben sich beim Erwärmen mit Frucht-

Blutkohle hat sich als recht wirksam erwiesen. Selbstverständlich muß eine Blutkohle, deren Reinheit von vornherein nicht bekannt ist, erst auf ihr Verhalten gegen die blaue Bang'sche Lösung untersucht werden, was am besten auf kolorimetrischem Wege geschieht, indem man bei verschiedenen Konzentrationen und zwar vor und nach dem Schütteln mit der in Frage kommenden Blutkohle im Kolorimeter auf Farbengleichheit einstellt. Es darf hierbei höchstens ein Unterschied von zwei Skalenteilen eintreten; andernfalls ist die Blutkohle als Entfärbungsmittel für die kolorimetrischen Traubenzuckerbestimmungen ungeeignet.

zucker gelb oder braun, ferner wirkt Fruchtzucker wie Traubenzucker auf viele Metalloxyde reduzierend, nur ist sein Reduktionsvermögen für Kupferoxyd geringer wie dasjenige des Traubenzuckers. Ebenso reduziert er die Knapp'sche alkalische Quecksilbercyanidlösung, und zwar nahezu in dem gleichen Maße wie Traubenzucker. — Mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung bildet Fruktose beim Erwärmen ihrer Lösung noch leichter Phenylglukosazon wie Glukose.

Nachweis des Fruchtzuckers im Harn.

Enthält der zu untersuchende Harn keinen Traubenzucker, so bereitet der Nachweis des Fruchtzuckers keine größeren Schwierigkeiten; ein solcher fruchtzuckerhaltiger Harn ist linksdrehend und die Substanz, welche die Linksdrehung hervorruft, vergährt mit Hefe vollständig (Unterschied von der linksdrehenden Modifikation der β-Oxybuttersäure); ferner gibt ein solcher Harn die gewöhnlichen Reduktionsproben, nämlich die Trommer'sche, Fehling'sche sowie die Almen-Nylander'sche Probe und liefert beim Erwärmen mit einer Lösung von essigsaurem Phenylhydrazin das auch aus Traubenzucker und Mannose sich bildende Phenylglukosazon vom Schup. 203—204°. — Als weitere für Fruchtzucker mehr oder weniger charakteristische Reaktion dient die Seliwanoff'sche Probe[1]. Erwärmt man einen Fruchtzucker enthaltenden Harn mit dem gleichen Volumen 25%iger Salzsäure und wenig Resorcin[2] rasch bis gerade zum Kochen, so färbt sich das Gemisch rot und setzt einen dunkeln, in Alkohol mit schön roter Farbe löslichen Niederschlag ab. Rohrzucker und Raffinose, welche beim Erhitzen mit Salzsäure Fruchtzucker liefern, geben selbstverständlich diese Probe ebenfalls; aber Traubenzucker, Galaktose, Milchzucker, Mannose und die Pentosen geben sie nicht.

Rosin[3] hat die Empfindlichkeit der Seliwanoff'schen Probe durch die folgende Arbeitsweise erhöht: Man stellt zunächst durch Aufkochen des fraglichen Harns mit dem gleichen Volumen 25%iger Salzsäure und einigen Körnchen Resorcin die Seliwanoff'sche Probe an. Ist die Rotfärbung eingetreten, so läßt man erkalten, fügt festes Natriumcarbonat bis kein Aufbrausen mehr erfolgt, hinzu, und schüttelt dann die hierbei heller, nämlich orangefarben, aber trübe gewordene alkalische Flüssigkeit mit Amylalkohol kräftig durch. Letzterer nimmt einen roten Farbstoff auf, der einen Stich ins gelbliche zeigt, schwach grün fluoresziert und durch Zusatz einiger Tropfen absoluten Alkohols eine rein rosarote Färbung annimmt. Diese Farbstofflösung zeigt ein charakteristisches Spektrum, selbst noch bei erheblicherer Verdünnung. Verdünntere Lösungen lassen einen einzigen Streifen im Grün bei der

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 20, 181 (1887).

[2]) Resorcin $C_6H_4(OH)_2$ = meta-Dioxybenzol, farblose oder schwach gefärbte, in Wasser, Weingeist und Aether leicht lösliche Kristalle vom Schmp. 110—111°.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 555 (1903).

Linie E bis zu b hin erkennen, konzentriertere Lösungen zeigen diesen Streifen sehr dunkel und daneben noch einen schärferen zweiten Streifen im Blau bei der Linie F. — Sehr stark konzentrierte Lösungen absorbieren das Spektrum vom Grün an. Ein Zusatz von Alkohol, welcher die Farbe von rotgelb in rosarot verwandelt, bewirkt ein schärferes Hervortreten des Streifens im Grün. Außer Fruchtzucker gibt auch Sorbose die Reaktion. Auch das salzsaure Glukosamin zeigt die Probe schwach.

Die von L. Borchardt[1]) modifizierte Seliwanoff'sche Reaktion. Man führe die Seliwanoff'sche Reaktion in der oben angegebenen Weise aus. Ist Rotfärbung des Gemisches eingetreten, so kühlt man gut ab, gießt das Gemisch in ein Becherglas, macht mit Soda in Substanz alkalisch, bringt es in das Reagenzglas zurück und schüttelt mit Essigäther aus. Ist der Harn fruchtzuckerhaltig, so färbt sich der Essigäther gelb. Die Probe ist recht empfindlich; sie fällt bei einem Fruchtzuckergehalt von nur 0,05% sowohl in einer wässerigen Lösung, als auch im Laevuloseharn, sowie in einem Harn, dem Trauben- und Fruchtzucker zugesetzt waren, noch positiv aus.

Das gleichzeitige Vorhandensein von Indikan und Alkalinitrit in deutlich nachweisbarer Menge gibt einen positiven Ausfall der Probe, auch wenn Fruchtzucker nicht zugegen ist. Auch ein hoher Urobilingehalt des Harns soll nach A. Jolles zu Verwechslungen führen können.

Milchzucker.

Milchzucker, $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$, kann im Harn von Wöchnerinnen bei Milchstauung vorkommen, ein Zustand, den man »Lactosurie« nennt. Nach innerlicher Darreichung von Milchzucker in größerer Menge, von 100 g und mehr, enthält der Harn meist eine deutlich nachweisbare Menge von Milchzucker. Beim Diabetiker tritt nach reichlichem Genusse von Milchzucker eine entsprechende Menge Traubenzucker im Harne auf, und umgekehrt können Wöchnerinnen nach Einnahme von viel Traubenzucker, 150 g und mehr, in ihrem Harne Milchzucker ausscheiden. Die Assimilationsgrenze für Milchzucker liegt bei einem erwachsenen Menschen bei ca. 100 g; aber auch nach innerlicher Darreichung von 150 g Milchzucker hat man beim gesunden Menschen nicht immer Lactosurie eintreten sehen. Bei Wöchnerinnen ist die Assimilationsgrenze herabgesetzt, so daß dann schon 100 g, manchmal sogar schon 50 g genügen, um Lactosurie zu erzeugen (von Noorden). Auch Erkrankungen des Magen-Darmkanals sollen die Assimilationsgrenze für Milchzucker bedeutend herabsetzen können.

Intravenös injizierter Milchzucker, 1 bis 2 g, gelangt beim gesunden Menschen innerhalb 4 bis 5 Stunden bis zu 90% mit dem Harn wieder zur Ausscheidung. (Schlayer und Takayasu[2]).

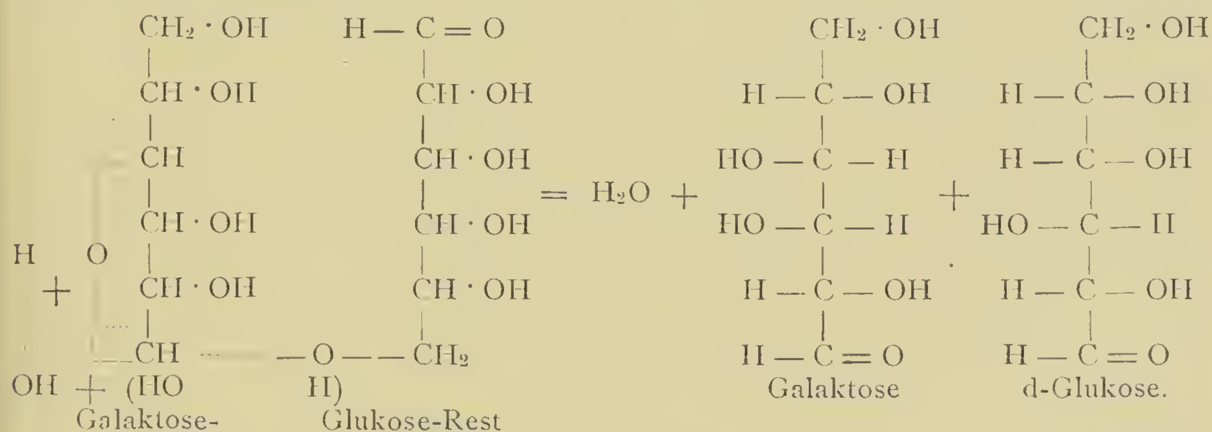
Darstellung des Milchzuckers aus Milch. Man fällt aus der Milch mittels Lab oder, nach starker Verdünnung mit Wasser —

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 248 (1908).

[2]) Deutsches Archiv für klinische Medizin 101, 333 (1910).

20 ccm Milch auf 400 ccm Wasser —, mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure Caseïn und Fett und aus dem Filtrate durch Aufkochen das Albumin aus. Beim Eindampfen des hierbei erhaltenen klaren Filtrats, welches nur noch Salze und Milchzucker enthält, kristallisiert der letztere beim Eindampfen zum Syrup aus und wird dann durch Umkristallisieren aus Wasser, zuletzt durch Ausfällen der wässerigen Lösung mit Alkohol, rein erhalten.

Eigenschaften. Milchzucker bildet rhombische Kristalle, die bei 100° langsam ihr Kristallwasser verlieren und bei 110° wasserfrei werden; nach Angabe anderer Autoren soll letzteres erst bei 130° erfolgen; bei höherer Temperatur wird er unter weiterer Wasserabgabe zersetzt. Milchzucker löst sich in 7 Teilen Wasser von 15° und in 1 Teile siedendem Wasser; die wässerigen Lösungen schmecken nur schwach süß. Er ist unlöslich in absolutem Alkohol, Aether, Aceton und Chloroform. Die wässerige Lösung des Milchzuckers dreht den polarisierten Lichtstrahl nach rechts. Auf das Hydrat bezogen, beträgt bei 20° $[\alpha]_D = + 52{,}5^0$. Frisch bereitete Lösungen zeigen Multiratation; die Anfangsdrehung einer 4,8%igen Lösung beträgt 82,9°; sie geht innerhalb 24 Stunden auf die normale Drehung + 52,5° zurück. Beim Erwärmen mit Alkalilaugen färben sich Milchzuckerlösungen unter Bildung von Milchsäure und Ameisensäure gelb. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wird Michzucker in d-Glukose und Galaktose hydrolytisch gespalten. Emulsin bewirkt leicht die gleiche Spaltung (Emil Fischer)[1]:



Von reiner Hefe wird Milchzucker nicht in Gährung versetzt und auch nicht von dem Enzym Zymase. Bierhefe wächst zwar in Milchzuckerlösungen, bewirkt aber keine Gährung und keine Inversion. — Milchzucker läßt sich in Salpetersäureester überführen; aus 1 Tl. Milchzucker und 5 Tln. Salpetersäure von der Dichte 1,5, sowie dem doppelten Volumen konzentrierter Schwefelsäure wird Milchzuckeroctonitrat $C_{12}H_{16}O_3(ONO_2)_8$ erhalten, monokline Blättchen aus Alkohol. Die Entstehung dieser Verbindung beweist, daß Milchzucker ein achtwertiger Alkohol ist. Milchzucker reduziert bei Gegenwart von Alkalilauge Kupferoxyd, Wismutoxyd und Quecksilberoxyd. Die Reduk-

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 27, 2988 (1894).

tion des Kupferoxyds erfolgt schon in der Kälte, freilich sehr langsam, rascher beim Erwärmen. Das Barfoed'sche Reagens wird im Unterschiede zum Traubenzucker durch Milchzucker nicht reduziert.

Nachweis des Milchzuckers im Harn.

1. Die A. Wöhlk[1])-H. Malfatti'sche[2]) Probe. Man vermischt in einem nicht zu kleinen Reagensglase 5 ccm des betreffenden Harns mit 3 bis 4 ccm starkem, mindestens 10%igem wässerigem Ammoniak und 4 Tropfen Kalilauge, schüttelt um, stellt das Reagensglas mit dem Gemisch in ein Becherglas, in welchem sich heißes, aber nicht siedendes Wasser befindet, und läßt es 10 Minuten lang darin stehen. Enthält der Harn 0,4% oder mehr Milchzucker, so färbt sich das Gemisch schon innerhalb der ersten 5 Minuten schön himbeer- bis rubinrot. Bei einem Gehalt von nur 0,2% Milchzucker tritt die Rotfärbung erst nach etwa 10 Minuten deutlich auf. Zweckmäßig führt man in der gleichen Weise und in demselben Wasserbade einen Kontrollversuch mit einem milchzuckerfreiem Harn aus. Traubenzucker allein in einem Harne bewirkt beim Anstellen dieser Probe nur dann eine rein braune oder braunrote Färbung, wenn der Harn mehr als 1% Traubenzucker enthält. Traubenzucker, der neben Milchzucker in einem Harne vorhanden ist, beeinträchtigt die Empfindlichkeit der Wöhlk-Malfatti'schen Milchzuckerprobe nur unwesentlich, wenigstens so lange der Traubenzuckergehalt nicht größer als 1% ist. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Traubenzucker ist die durch den Milchzucker bedingte Färbung meist nicht rein rubinrot, sondern zeigt gleichzeitig einen Stich ins Bräunliche.

2. Nachweis der Gährungsunfähigkeit mit reiner, wirksamer Hefe. Die in der käuflichen Hefe wie auch die im Harne meist enthaltenen Spaltpilze können Milchzucker zum Teil zerstören. Der Gährungsversuch muß daher mit einer Reinkultur von Hefe und mit sterilisiertem Harne angestellt werden. Letzteres wird erreicht durch zweistündiges Erhitzen des Harns im strömenden Dampf. Für die Gährung verwendet man zweckmäßig Saccharomyces apiculatus, welcher Traubenzucker langsam, aber vollständig vergährt. Reduziert der Harn nach dem Gährungsversuche noch, so ist nur bewiesen, daß eine gährungsunfähige Substanz, höchst wahrscheinlich ein gährungsunfähiger Zucker, in dem Harne vorhanden ist. — Pentose verhält sich in dieser Hinsicht wie Milchzucker, sie vergährt hierbei nicht.

3. Nachweis der aus Milchzucker gebildeten Schleimsäure nach Richard Bauer[3]). 100 ccm Harn werden mit 20 ccm reiner konzentrierter Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) in einem breiteren, wenig tiefen Becherglase im siedenden Wasserbade eingedampft. Auf

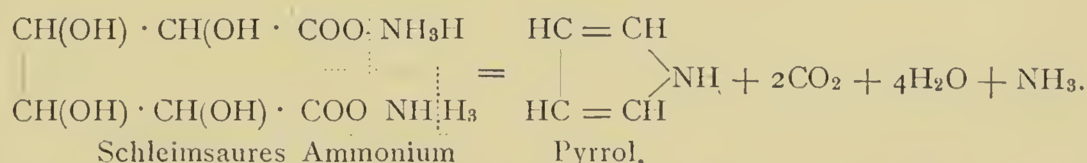
---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 43, 670 (1904).

[2]) Zentralblatt f. Krankheiten d. Harn- und Sexualorgane 16, 68 (1905).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 158 (1907).

Zusatz der Salpetersäure färbt sich der Harn in der Regel dunkel, wird aber dann beim Erwärmen bald wieder heller und bleibt so lange hell, bis er auf 40 bis 50 ccm eingedampft ist. In diesem Stadium beginnt die Flüssigkeit sich braun zu färben, gerät in gelindes Schäumen, und es entweichen, besonders beim Umschütteln, reichlich braune Dämpfe von Stickstoffdioxyd, ein Zeichen, daß jetzt die Oxydation beginnt. Die Stickstoffdioxydentwicklung dauert gewöhnlich so lange, bis der Harn auf etwa 20 ccm eingedampft ist. Nun wird die Flüssigkeit heller, hört auf zu schäumen, und es beginnt in der gelben, früher klaren Flüssigkeit ein feiner, weißer Niederschlag sich zu bilden, der rasch an Menge zunimmt. Man nimmt jetzt das Becherglas aus dem Wasserbade heraus und stellt es bis zum anderen Tage an einen kühlen Ort, am besten in einen Eisschrank. Nun wird mit Wasser verdünnt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Wasser wiederholt ausgewaschen, dann noch mit Alkohol und Aether nachgespült, getrocknet und gewogen. Der getrocknete Niederschlag zerfällt zu einem feinen, weißen Pulver, das in kaltem Wasser gar nicht, in siedendem Wasser nur schwer löslich ist. Das Pulver, rohe Schleimsäure, schmilzt im rohen Zustande bei 213 bis 215^0 unter Aufschäumen und Verkohlung. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von wenig gut wirkender Blutkohle erhält man die Schleimsäure $COOH(CHOH)_4COOH$ in glitzernden, mikroskopisch kleinen Prismen vom Schmp. 217 bis 220^0. Zahlreiche Kontrollversuche haben ergeben, daß aus Harnen, die weder Milchzucker noch Galaktose enthalten haben, schleimsäurehaltige Niederschläge nicht erhalten werden (R. Bauer)[1]. Zur Identifizierung der erhaltenen Schleimsäure verdampft man die trockene Substanz mit starkem Ammoniak auf dem Wasserbade zur Trockne und erhitzt den Rückstand in einem trockenen Probierröhrchen; ein mit Salzsäure befeuchteter Fichtenspahn färbt sich rot, wenn er in die sich entwickelnden pyrrolhaltigen Dämpfe gehalten wird. Das hierbei zunächst gebildete schleimsaure Ammonium zerfällt nämlich bei der trockenen Destillation, indem neben anderen Substanzen auch Pyrrol entsteht, das den mit Salzsäure angefeuchteten Fichtenspahn rot färbt:



$$\begin{array}{l} CH(OH)\cdot CH(OH\cdot COO\,NH_3H \\ | \\ CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot COO\,NH\,H_3 \end{array} = \begin{array}{l} HC=CH \\ | \quad\quad > NH \\ HC=CH \end{array} + 2CO_2 + 4H_2O + NH_3.$$

Schleimsaures Ammonium — Pyrrol.

Die kolorimetrische Bestimmung des Milchzuckers im Harn nach W. Autenrieth und A. Funk[2].

Milchzucker wirkt auf eine alkalische Kupferlösung wie die Fehling'sche Lösung reduzierend ein und zwar unter Abscheidung von

[1]) »Alimentäre Galaktosurie und Lactosurie beim gesunden und kranken Menschen«. Wiener medizinische Wochenschrift 1906. 1.

[2]) Münchener medizinische Wochenschrift, 58. Jahrgg., 1717 (1911).

Kupferoxydul. Führt man hierbei den Versuch mit der blauen Bang'schen Kupferlösung aus, so entsteht nicht rotes Kupferoxydul, sondern weißes Kupferrhodanür CNSCu, welches durch das im Ueberschusse vorhandene Kaliumrhodanid in Lösung bleibt; nimmt man überschüssige Bang'sche Lösung, so erhält man somit nach Beendigung des Versuchs eine klare, noch blau gefärbte Flüssigkeit, deren kolorimetrischer Wert mit Hilfe des Autenrieth-Koenigsberger'schen Kolorimeters ermittelt werden kann.

Erfordernisse. 1. Das obengenannte Kolorimeter. 2. Die blaue Bang-sche Kupferlösung, deren Bereitung auf S. 127 angegeben ist.

Eichung des Glaskeiles des Kolorimeters[1]. Die mit blauer Bang'scher Lösung zu füllenden offenen Glaskeile wie auch die mit einer optisch gleichwertigen Farbstofflösung bereits gefüllten, geschlossenen Keile müssen erst mit reinem, aschefreiem Milchzucker geeicht werden, der vor dem Abwägen bei 120° auszutrocknen ist. Man stellt sich dann mit dem so erhaltenen kristallwasserfreien Milchzucker eine 0,5%ige Lösung her, bringt diese in eine Bürette, mißt wechselnde Mengen derselben, nämlich 9, 8, 7 ccm usw. ab, läßt aus einer zweiten Bürette die zur Ergänzung auf 10 ccm nötige Menge Wasser, ferner 50 ccm blaue Bang'sche Lösung zufließen, kocht dieses Gemisch jeweils drei Minuten und verfährt im übrigen, in der weiter unten für den Harn angegebenen Weise. Von jeder der angewandten Milchzuckerkonzentrationen bestimmt man ihren kolorimetrischen Wert im Kolorimeter, indem man den Glaskeil bis zur Farbengleichheit verschiebt, liest dann den entsprechenden Skalenteil am Kolorimeter ab, trägt den letzteren auf der Ordinatenachse und die zugehörige Menge Milchzucker, welche in 10 ccm der angewandten Lösung enthalten ist, auf der Abscissenaxe eines Koordinatensystems ein. Auf diese Weise wurden beispielsweise die folgenden Werte ermittelt, welche zur Konstruktion der unten aufgezeichneten Milchzuckerkurve führten.

0,5%ige Milchzuckerlösung		Wasser.	Milchzucker in 10 ccm Lösung	Farbengleichheit bei Skalenteil:
1 ccm	+	9 ccm	5 mgr	11
2 »	+	8 »	10 »	18
3 »	+	7 »	15 »	25
4 »	+	6 »	20 »	33
5 »	+	5 »	25 »	40
6 »	+	4 »	30 »	48
7 »	+	3 »	35 »	55
8 »	+	2 »	40 »	63.

Milchzuckerkurve (s. S. 137).

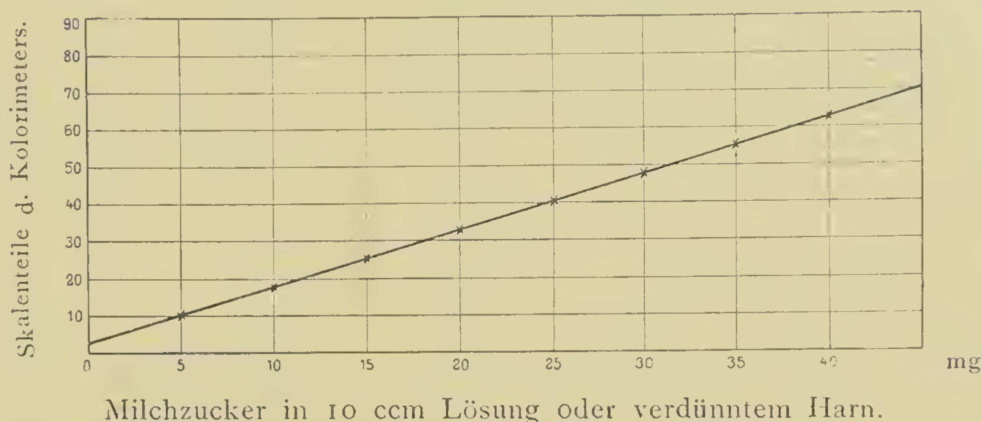
Ausführung im Harn. Ein Harn, dessen Milchzuckergehalt kolorimetrisch bestimmt werden soll, darf in 10 ccm höchstens 40 mg $C_{12}H_{22}O_{11}$, also nicht mehr als 0,4% Milchzucker enthalten; ist der Milchzuckergehalt voraussichtlich größer als 0,4%, so muß der Harn vorher entsprechend verdünnt werden. Die milchzuckerärmeren

[1] Die Firma Fr. Hellige dahier liefert für die kolorimetrische Bestimmung des Milchzuckers im Harn und in der Milch sowohl offene Glaskeile, welche mit der blauen Bang'schen Lösung zu füllen sind, als auch geschlossene, mit einer beständigen Farbstofflösung gefüllte Keile. Die letzteren können bereits geeicht bezogen werden.

Harne verdünnt man mit 2 bis 4 Vol. Wasser, und für milchzuckerreichere Harne wählt man eine Verdünnung mit 9 Vol. Wasser, verdünnt also auf das zehnfache.

Milchzuckerkurve.

Fig. 9.



Milchzucker in 10 ccm Lösung oder verdünntem Harn.

Man mißt dann in einem Meßkölbchen 50 ccm blaue Bang'sche Kupferlösung ab, bringt diese in ein Kochkölbchen aus Jenaer Glas von 150—200 ccm Inhalt, läßt 10 ccm von dem vorher entsprechend verdünnten Harne zufließen, erhitzt dieses Gemisch auf einem Drahtnetze zum Sieden, läßt genau drei Minuten lang tüchtig kochen, kühlt dann das Kölbchen rasch auf Zimmertemperatur ab und bringt dessen Inhalt unter Nachspülen mit Wasser oder besser wässeriger Rhodankaliumlösung ohne Verlust in das Meßkölbchen zurück. Nun füllt man bis zur Marke 50 auf, fügt ½ gr feine, eisenfreie Blutkohle hinzu, schüttelt gut durch, läßt 5 Minuten stehen und filtriert einige ccm durch ein trockenes doppeltes oder dreifaches Filterchen direkt in den Trog des Kolorimeters. Falls der letztere nicht vollkommen trocken ist, muß er zunächst mehrere Male mit dem Filtrate ausgespült werden. Nun befestigt man den Trog mit dem erhaltenen klaren und rein blauen Filtrat im Kolorimeter, verschiebt den Vergleichskeil bis zur Farbengleichheit und liest den zugehörigen Skalenteil ab. Von 6 Ablesungen legt man der kolorimetrischen Bestimmung das arithmetrische Mittel zu Grunde. In der Milchzuckerkurve sucht man dann den, dem ermittelten Skalenteile entsprechenden Milchzuckerwert auf und erfährt so die Anzahl Milligramme Milchzucker, welche in 10 ccm des angewandten verdünnten Harns enthalten sind. Bei der prozentischen Berechnung ist die Verdünnung des Harns zu berücksichtigen.

Beispiel. Verdünnung des Harns: 4 Vol. Harn + 6 Vol. Wasser. Farbengleichheit bei Skalenteil 31; nach obiger Kurve = 18,8 mg $C_{12}H_{22}O_{11}$ in 10 ccm des verdünnten oder in 4 ccm des ursprünglichen Harns. Dieser enthält somit 25 × 18,8 mgr = 0,47 % Milchzucker.

Bemerkungen. Der quantitativen Bestimmung des Milchzuckers muß selbstverständlich der sichere qualitative Nachweis dieses Zuckers vorausgehen, eine Aufgabe, die nicht immer leicht zu lösen ist. (S. oben). Handelt es sich um die Untersuchung eines Wöchnerinnenharns, so wird die Wöhlk-

Malfatti'sche Probe in den meisten Fällen die Frage entscheiden können, ob der fragliche Harn Milchzucker enthält oder nicht, denn mit dieser Probe erkennt man noch 0,2 % Milchzucker im Harn mit großer Sicherheit.

Kolorimetrische Bestimmung des Milchzuckers in der Frauenmilch. Gerade bei Lactosurie dürfte die Bestimmung des Milchzuckergehaltes der Milch in manchen Fällen von einem gewissen Interesse sein. Kolorimetrisch kann diese Bestimmung in kurzer Zeit und mit großer Genauigkeit ausgeführt werden. Zu dem Zweck bringt man 5 ccm der gut gemischten Milch in ein 100 ccm Meßkölbchen, fügt 80 ccm Wasser sowie 2 bis 4 Tröpfchen verdünnte Essigsäure hinzu, kocht einige Zeit, füllt nach dem Erkalten mit Wasser bis zur Marke auf und filtriert durch ein trockenes doppeltes Filter in ein trockenes Gefäß ab. 10 ccm des klaren, eiweißfreien Filtrates = 0,5 ccm ursprüngliche Milch werden mit 50 ccm blauer Bang'scher Lösung gekocht. Im übrigen wird nach dem für den Harn angegebenen Verfahren gearbeitet, nur daß in diesem Fall ein Schütteln der blauen Lösung nach dem Kochen mit Blutkohle nicht notwendig ist. Nach dem Erkalten und Auffüllen mit Wasser bis zur Marke 50 kann eine Probe der klaren, meist rein blauen Lösung direkt im Kolorimeter untersucht werden.

Bemerkungen. Die kolorimetrische Methode der Milchzuckerbestimmung in der Milch liefert die gleichen Werte wie die ältere Allihn'sche Methode. — Beispiel. Es wurde eine Frauenmilch untersucht. 1. Nach Allihn wurden 6,92 % Milchzucker gefunden. 2. Kolorimetrische Bestimmung. 10 ccm der mit Wasser auf das zwanzigfache verdünnten Milch (s. oben) lieferten bei Skalenteil 54 Farbengleichheit, was nach der obigen Milchzuckerkurve, = 34,4 mgr $C_{12}H_{22}O_{11}$ in 0,5 ccm Milch, oder 6,88 % Milchzucker entspricht.

Die kolorimetrische Methode der Milchzuckerbestimmung ist somit der Allihnschen Methode durchaus gleichwertig; während aber die Ausführung der letzteren mindestens 3—4 Stunden beansprucht, kann eine kolorimetrische Bestimmung bequem in 1/2 Stunde ausgeführt werden. Nur die Vorbereitung der Milch, nämlich das Ausfällen von Albumin, Caseïen, Fett, etc. ist hierbei zeitraubend, eine Arbeit, die aber für beide Methoden die gleiche ist.

Pentosen.

Bei der alimentären Pentosurie kann aus der Pflanzennahrung stammende l-Arabinose in den Harn übergehen. Bei einem Falle von chronischer Pentosurie hat C. Neuberg aus dem Harne l-Arabinose isolieren können. Kleinere Pentosenmengen sollen nicht selten im Harne der Diabetiker vorkommen; in verschiedenen Fällen konnte die Pentose in Form ihres Osazons aus dem Harne dargestellt werden. Auch im Harne von Hunden mit Pankreasdiabetes oder Phloridzindiabetes ließ sich meist Pentose nachweisen. — Pentose wird im Körper nur unvollständig verbrannt und geht daher leicht in den Harn über, viel leichter als jeder andere Zucker. Nach Einnahme von 25 g Arabinose findet sich in den ersten Stunden reichlich Pentose im Harne vor. (Tollens[1]);

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 29, 1208 (1896).

nach Eingabe von 25 g Arabinose hat Cremer[1]) aus dem Harne wieder 10 g derselben darstellen können. Bei dem Versuche von Tollens konnte nach 24 Stunden in dem Harn Pentose nicht mehr nachgewiesen werden. Nach dem Genusse bestimmter Früchte, nämlich von Kirschen, Pflaumen, ferner von Fruchtsäften wie Kirschsaft und Apfelmost kann Pentose im Harn auftreten. Bei der ächten Pentosurie handelt es sich nach C. Neuberg[2]) höchstwahrscheinlich um die optisch inaktive racemische Arabinose ($C_5H_{10}O_5$.) Diese Arabinose bildet Drusen farbloser, harter Prismen vom Schmp. 160—167^0, schmeckt rein süß, ist optisch inaktiv und nicht gährungsfähig[3]).

Nachweis von Pentose im Harn.

Ein pentosehaltiger Harn reduziert alkalische Kupferoxyd- und Wismutoxydlösung; aus der ersteren Lösung scheidet sich das Kupferoxyd meist nicht so rasch aus wie dies bei Vorhandensein von Traubenzucker der Fall ist. Wenn ein Fall von reiner Pentosurie vorliegt, so vergährt der Harn nicht mit Hefe; bei gleichzeitigem Vorhandensein von Traubenzucker können aber kleinere Pentosemengen gleichfalls in Gährung übergehen. Zum Nachweis von Pentose im Harn dienen die folgenden Proben.

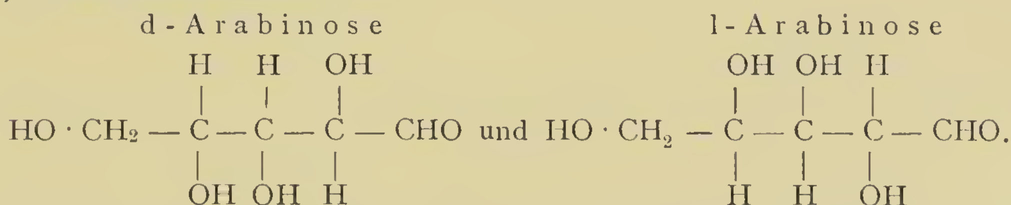
1. Die Phloroglucinprobe[4]). Man versetzt 10 ccm Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19), fügt 25 bis 30 mg Phloroglucin hinzu und erwärmt ganz allmählich bis zum

---

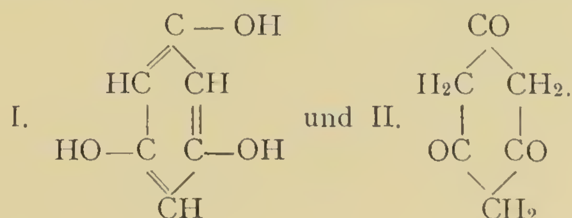
[1]) Zeitschr. f. Biologie 29, 541 (1893).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 33, 2243 (1900).

[3]) Konstitutionsformeln von



[4]) Phloroglucin, $C_6H_3(OH)_3$, 1,3,5-Trioxybenzol, kristallisiert aus Wasser in farblosen, 2 Mol. Kristallwasser enthaltenden Tafeln, die bei 100^0 kristallwasserfrei werden und dann bei 217—219^0 schmelzen; es gibt in konzentrierteren Lösungen mit Eisenchlorid eine blauviolette Färbung und reduziert Fehling'sche Lösung. Verdünnte Phloroglucinlösungen färben einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspahn rot, eine Eigenschaft, die zum Nachweis von Holzsubstanz verwendet werden kann. Phloroglucin bildet ein klassisches Beispiel für die Erscheinung der Tautomerie, indem es als dreiwertiges Phenol (I), Trialkyläther $C_6H_3(OR)_3$ und als Triketon (II) ein Trioxim $C_6H_6(NOH)_3$ bildet:



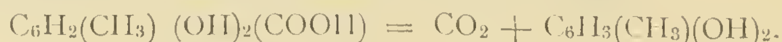
beginnenden Kochen; das Gemisch färbt sich schön violettrot oder kirschrot, wenn der Harn Pentose enthält.

Bei der spektroskopischen Untersuchung dieses Gemisches zeigt sich ein Absorptionsstreifen zwischen D und E, also rechts von der Natriumlinie. Da das Harngemisch sich bald trübt, muß die spektroskopische Untersuchung sofort ausgeführt werden. Die Probe kann unter Anwendung der Tollensschen Absatzmethode[1]) verschärft werden: Man läßt das nach den obigen Angaben hergestellte, noch heiße Harn-Phloroglucin-Salzsäuregemisch 3 Minuten ruhig absitzen, kühlt dann unter der Wasserleitung rasch ab, sammelt den Niederschlag auf einem vorher angefeuchteten kleineren Filter, spült ihn mit kaltem Wasser so lange aus, bis das Filtrat fast farblos abfließt und löst ihn dann auf dem Filter in 95%igem Alkohol; bei Vorhandensein von Pentose im Harn färbt sich der Alkohol hierbei violettrot. Die so erhaltene alkoholische Lösung, die eventuell noch mit Alkohol zu verdünnen ist, falls sie zu dunkel gefärbt erscheint, zeigt den Pentosenstreifen sehr schön. Die Violettfärbung, welche der Absatz beim Auswaschen mit Wasser annimmt und welche die alkoholische Lösung des Absatzes zeigt, ist immer vorhanden, falls Pentosen gegenwärtig sind, aber sie ist ohne den Absorptionsstreifen kein Beweis für das Vorhandensein von Pentosen, denn auch Galaktose und solche Zucker, welche Galaktose liefern wie Milchzucker und Raffinose, geben einen mehr oder weniger violetten Absatz, und auch die alkoholischen Lösungen des letzteren sind violettbraun gefärbt, aber sie geben keinen Absorptionsstreifen in der letztgenannten Flüssigkeit. — Eiweiß stört die Phloroglucinprobe nicht. Wohl aber gibt Glukuronsäure die Phloroglucinprobe.

2. Die Orcinprobe[2]). Man mischt 5 ccm des betreffenden Harns mit

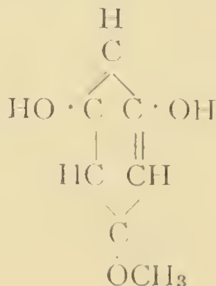
[1]) Berichte der Deutsch. chem. Ges. 29, 1208 (1896).

[2]) Orcin, 1-Methyl-3,5-dioxybenzol $C_6H_3(CH_3)(OH)_2 + H_2O$, ist das wichtigste der 6 nach der Theorie möglichen und auch dargestellten Dioxytoluole, kristallisiert in farblosen, in Wasser, Alkohol und Aether leicht löslichen, süßlich schmeckenden Prismen; eine wässerige Orcinlösung färbt sich mit Eisenchlorid blauviolett; im wasserhaltigen Zustande schmilzt es bei 56°, wasserfrei bei 107°. Orcin findet sich in vielen Flechten der Gattungen Roccella und Lecanora, teils im freien Zustande, teils als Orcinkarbonsäure oder Orsellinsäure, teils als Erythrin oder Diorsellinsäure-Erythritester. Es wird aus Orsellinsäure durch trockene Destillation oder durch Kochen mit Kalk erhalten:



$$C_6H_2(CH_3)(OH)_2(COOH) = CO_2 + C_6H_3(CH_3)(OH)_2.$$

Konstitutionsformel des Orcins:



dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) fügt eine kleine Menge, etwa eine kleine Messerspitze voll Orcin hinzu und erhitzt zum Sieden. Macht sich eine grünliche oder bläuliche Färbung bemerkbar, so kühlt man bis zur Lauwärme ab und schüttelt vorsichtig mit reinem Amylalkohol aus, indem man stärkeres Umschütteln vermeidet. Die klare, grün gefärbte amylalkoholische Lösung dient für die spektroskopische Untersuchung. Wenn man nach der, unter der Phloroglucinprobe, angegebenen Tollensschen Absatzmethode arbeitet, erhält man eine gesättigt grüne Lösung, welche eine Absorption in der Gegend der Natriumlinie D des Spektrums sehr scharf zeigt.

3. Die Bialsche Orcinprobe. Durch Zusatz einer Spur Eisenchlorid wird die Empfindlichkeit der Orcinprobe auf Pentosen gesteigert. Bial benutzt als Reagens eine Lösung von 1 g Orcin in 500 ccm Salzsäure von 30% HCl, die mit 25 Tropfen offizineller Eisenchloridlösung (Liquor Ferri sesquichlorati) versetzt ist. 4 bis 5 ccm dieses Reagenses werden zum Sieden erhitzt, alsdann wird zu der heißen, aber nicht mehr siedenden Flüssigkeit höchstens 1 ccm des betreffenden Harns zugesetzt. Enthält der Harn Pentose, so nimmt das Gemisch hierbei eine schöne grüne Färbung an. — Das Reagens ist längere Zeit haltbar, wenn es in einer dunkeln Flasche aufbewahrt wird. Normaler oder traubenzuckerhaltiger Harn gibt die Bialsche Orcinprobe nicht, ebensowenig die gepaarten Glukuronsäuren.

Beim Nachweis der Pentosen muß man eine Filtration der in Frage kommenden Flüssigkeiten durch Filtrierpapier zu vermeiden suchen, da es Papiere gibt, die besonders bei Gegenwart von Alkalilaugen, an Lösungen Substanzen abgeben können, welche dann die Phloroglucin- und Orcinprobe geben.

4. Die A. Neumannsche Orcinprobe[1]). 10 Tropfen des betreffenden Harns werden in einem Reagenzglase mit 5 ccm 99%igem Eisessig und einigen Tropfen einer 5%igen alkoholischen Orcinlösung versetzt, dann umgeschüttelt und zum Sieden erhitzt. Während das Reagenzglas mit einem Halter gehalten wird, setzt man tropfenweise unter Umschütteln konz. Schwefelsäure hinzu, bis ein deutlicher Farbenton bestehen bleibt. Mehr als 50 Tropfen Schwefelsäure sind dazu in keinem Falle nötig. — Arabinose gibt bei der Neumannschen Probe Violettfärbung sowie im Spektrum einen Streifen rechts von D, der das Gelb bis Gelbgrün bedeckt. Xylose: Violettfärbung, sowie zwei Streifen, einen rechts von C im Orange und einen zweiten wie bei der Arabinose. — Glukuronsäure: Grün- oder Grünblaufärbung mit einem Streifen links von C im Rot. — Traubenzucker: Braunrotfärbung mit einem Streifen im Grün.

5. Die Phenylhydrazinprobe. Für den sicheren Nachweis der Pentosen im Harn dient auch das Osazon. (Salkowski) 200 bis 500 ccm des fraglichen Harns werden in einem Becherglase auf je 100

[1]) Berliner Klinische Wochenschrift 1904. 1073.

ccm Harn mit je 2,5 g in überschüssiger Essigsäure gelöstem Phenylhydrazin zum beginnenden Sieden erhitzt; dann läßt man das Becherglas noch 1—1¼ Stunde auf dem siedenden Wasserbade stehen und läßt nun erkalten. Enthält der Harn Pentose in einigermaßen erheblicher Menge, so füllt sich das Harngemisch mit gelben Osazonkristallen an. Zur Charakterisierung der Pentosazonkristalle und Unterscheidung von den ebenfalls gelben Phenylglucosazonkristallen kristallisiert man die erhaltenen Kristalle so oft aus stark verdünntem heißem Alkohol um, bis zwei nacheinander erhaltene Präparate den gleichen Schmelzpunkt zeigen. Er wird zu 159—167° gefunden, falls eine Pentose vorliegt. raz.-Arabinosazon schmilzt bei 166—168° (C. Neuberg) und scheidet sich in voluminösen Massen gelber Nadeln oder aber in reingelben Prismen aus.

Glukuronsäure und gepaarte Glukuronsäuren.

Freie Glukuronsäure $C_6H_{10}O_7$ oder Salze derselben finden sich nicht im Tierkörper vor, sondern nur gepaarte Verbindungen, welche im Molekül als den einen Paarling Glukuronsäure enthalten; es sind dies die »gepaarten Glukuronsäuren«, die Analoga zu den gepaarten Schwefelsäuren. Sehr viele organische Verbindungen, und zwar solche der aliplatischen und aromatischen Reihe, werden im Tierkörper, manchmal unter vorausgegangener chemischer Umformung, als gepaarte Glukuronsäuren ausgeschieden. Zu diesen Substanzen gehören unter Anderen Kampfer, Chloralhydrat, Butylchloralhydrat, Phenol, Naphtol, Thymol, Borneol, Menthol, Morphin, Terpene.

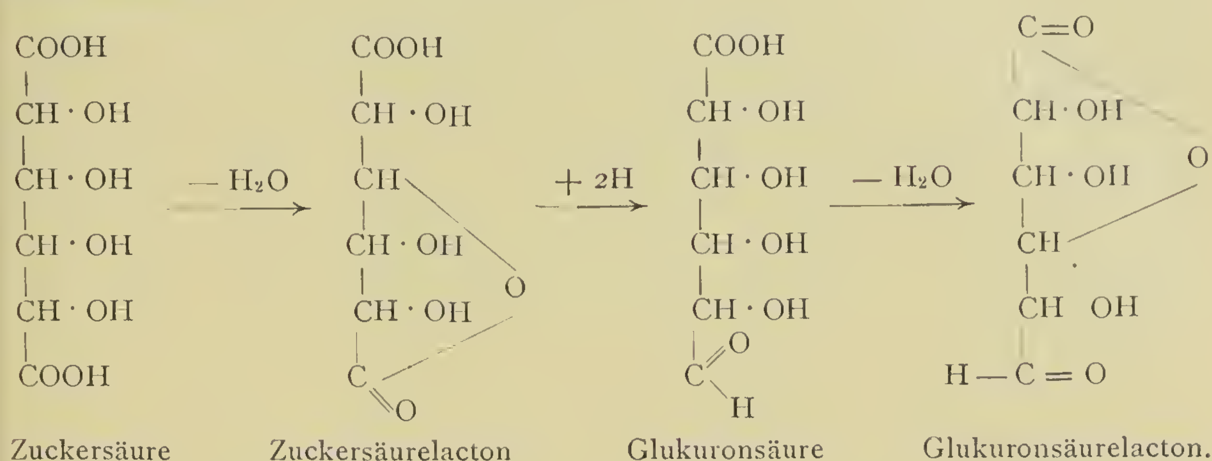
Ob normalerweise im Harn gepaarte Glukuronsäuren vorkommen können, war lange Zeit eine strittige Frage. Diese Frage ist jetzt zu bejahen, denn nach Untersuchungen von P. Mayer und C. Neuberg[1]) finden sich auch im normalen Menschenharn kleine Mengen gepaarter Glukuronsäuren, nämlich Phenolglukuronsäure und höchstwahrscheinlich auch Indoxyl- und Skatoxylglukuronsäure. Verschiedene der gepaarten Glukuronsäuren hat man im kristallisierten Zustande aus dem Harne darstellen können; zu diesen gehören die Camphoglukuronsäure nach Eingabe von Kampfer (Schmiedeberg und Meyer[2]), die Urochloralsäure nach Eingabe von Chloralhydrat (von Mering[3]) die Euxanthinsäure nach Eingabe von Euxanthon, sowie die Phenolglukuronsäure und die Thymolglukuronsäure, welche entstehen, wenn Phenol bez. Thymol dem Organismus einverleibt wird.

Synthese der Glukuronsäure (Emil Fischer und O. Piloty[4]). Das Lacton der Zuckersäure wird in schwefelsaurer Lösung mit Natriumamalgam, also mit naszierendem Wasserstoff, reduziert und die

---

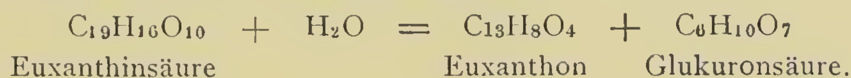
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 256 (1900).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 422 (1879).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 480 (1882).
[4]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 24, 521 (1891).

hierbei entstehende Glukuronsäure in Form ihres kristallisierenden Lactons isoliert:



Zuckersäure Zuckersäurelacton Glukuronsäure Glukuronsäurelacton.

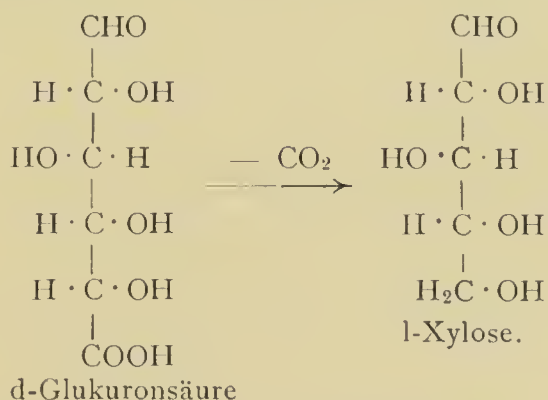
Darstellung. Die Euxanthinsäure, d. i. die Euxanthonglukuronsäure, ist das geeignetste Ausgangsmaterial für die Darstellung der Glukuronsäure (A. Spiegel[1]); sie wird bei 140° durch Wasser oder besser durch eine 2%ige Schwefelsäure in Euxanthon und das Anhydrid der Glukuronsäure hydrolytisch gespalten:


$$C_{19}H_{16}O_{10} + H_2O = C_{13}H_8O_4 + C_6H_{10}O_7$$
Euxanthinsäure Euxanthon Glukuronsäure.

Nach 3—4 Stunden langem Erhitzen erstarrt der Inhalt der Einschmelzröhren beim Erkalten zu einem Brei rein gelber Nadeln von Euxanthon; aus dem kaum gefärbten Filtrate läßt sich durch Eindampfen und Behandeln mit Tierkohle das Glukuronsäurelacton in wasserhellen, dicken Kristallen erhalten.

Die freie Glukuronsäure bildet einen Sirup, während ihr Lacton schön kristallisiert und bei langsamem Erhitzen zwischen 160—170° unter Zersetzung schmilzt. Die Glukuronsäure ist rechtsdrehend, $[\alpha]_D^{18} = + 19{,}25°$ für 8—14%ige Lösungen des Lactons. Die Salze kristallisieren zum Teil gut; die Glukuronsäure wird ausgefällt durch überschüssiges Barytwasser und aus neutraler oder schwach essigsaurer Lösung in der Wärme auch durch Bleiessig und zwar als basisches Salz. Glukuronsäure wirkt wie Glukose stark reduzierend, sie reduziert z. B. die Fehling'sche Lösung beim Erwärmen.

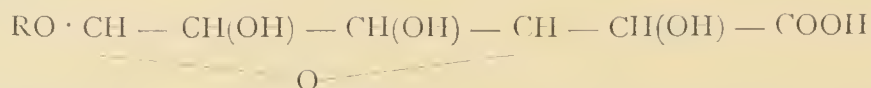
In Berührung mit Fäulnisgemischen spaltet d-Glukuronsäure Kohlendioxyd ab unter Bildung von l-Xylose (E. Salkowski und C. Neuberg[2]).



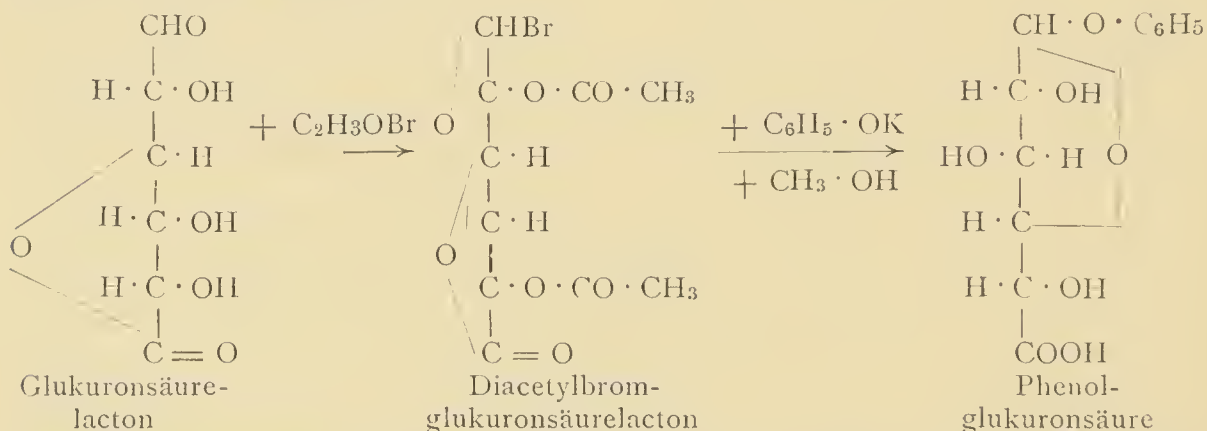
d-Glukuronsäure l-Xylose.

[1]) Berichte d. Deutsch, chem. Ges. 15, 1964 (1882).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 261 (1902).

Die gepaarten Glukuronsäuren sind sämtlich linksdrehend; sie werden durch Erwärmen mit verdünnten Säuren in Glukuronsäure und einen hydroxylhaltigen Paarling hydrolytisch gespalten; vergl. oben die Spaltung der Euxanthinsäure. Auch durch Emulsin werden einige, wie die Phenolglukuronsäure und die Euxanthinsäure hydrolisiert. Die Alkali- und besonders die Alkaloidsalze der meisten gepaarten Glukuronsäuren kristallisieren gut. Die meisten derselben reduzieren die Fehlingsche Lösung erst nach erfolgter Hydrolyse. Nach C. Neuberg und W. Neimann[1]) sind die gepaarten Glukuronsäuren nach dem Glukosidtypus



zusammengesetzt; diesen Forschern ist auch die künstliche Darstellung der Phenolglukuronsäure, Euxanthinsäure und Isoeuxanthinsäure geglückt. Zur Darstellung der Phenolglukuronsäure wird Glukuronsäurelacton mit Acetylbromid in Diacetylbromglukuronsäurelacton übergeführt, das bei längerem Stehen mit Phenol und Kaliummethylat in absolut methylalkoholischer Lösung Phenolglukuronsäure liefert. Es scheint aber, daß die Ausbeute an Phenolglukuronsäure bei dieser Reaktion eine geringe ist:



Phenolglukuronsäure wird aus heißem Wasser in langen, farblosen Nadeln vom Schm. 148—150° erhalten. $[\alpha]D = -83{,}3^0$ $(-81{,}9^0)$.

Nachweis der gepaarten Glukuronsäuren und der Glukuronsäure im Harn.

Ein Harn, welcher mehr als Spuren von gepaarten Glukuronsäuren enthält, zeigt Linksdrehung; kocht man einen solchen Harn mit Mineralsäuren, so nimmt die Linksdrehung ab und geht unter Umständen in eine Rechtsdrehung über, indem durch die Hydrolyse der gepaarten Säure die rechtsdrehende freie Glukuronsäure entsteht. Ferner zeigt ein solcher Harn nach dem Kochen ein starkes Reduktionsvermögen; er reduziert Fehlingsche Lösung beim Erwärmen. Vor dem Kochen reduziert ein Harn, der eine gepaarte Glukuronsäure enthält, entweder nicht oder nur ganz schwach. Glukuronsäure und gepaarte Glukuronsäure geben wie die

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 114 (1905).

Pentosen die Phloroglucin- und die Orcinprobe (vergl. Pentosen). Zur Unterscheidung von den Pentosen dient die von B. Tollens[1]) aufgefundene Reaktion mit Naphtoresorcin, Salzsäure und Aether, wobei nur Glukuronsäure und ihre gepaarten Derivate, nicht aber die Pentosen Arabinose und Xylose, charakteristische Farben- und Spektralerscheinungen zeigen, nämlich Blau- bis Rotfärbung und einen Absorptionsstreifen, der fast mit der Linie D zusammenfällt. Bei glukuronsäurehaltigem Harne färbt sich der Aether nicht blau, sondern lebhaft violett bis rot. Ausführung. Man verwende 5—6 ccm des zu prüfenden Harns, setze 0,5—1 ccm einer alkoholischen Naphtoresorcinlösung (1 %ig) und ein der Flüssigkeitsmenge im Probierrohre gleiches Volumen Salzsäure von 1,19 spez. Gew. hinzu, erwärme langsam zum Kochen, lasse unter Bewegung des Rohrs eine Minute lang gelinde kochen, setze dann das Rohr beiseite, schüttele es nach 4 Minuten unter einem Wasserstrahl bis zum Erkalten, gieße ein der Flüssigkeit gleiches Volumen Aether hinzu, schüttele gut durch und bringe die Aetherschicht nach dem Absitzen vor den Spalt eines Spektralapparates. Bei Vorhandensein von Glukuronsäure oder einer gepaarten Glukuronsäure im untersuchten Harn ist die Aetherschicht lebhaft rot oder rotviolett gefärbt und zeigt einen, fast auf der D-Linie liegenden, dunkeln Absorptionsstreifen. Der Nachweis der Glukuronsäure mit Hilfe der Tollensschen Reaktion gelingt auch, wenn der Harn gleichzeitig Pentosen enthält; Glukose, Galaktose, Rohrzucker und Milchzucker geben diese Probe nicht.

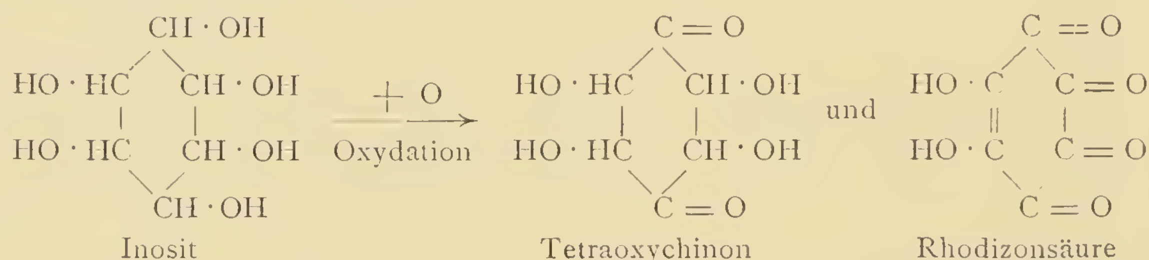
Inosit.

Inosit, Hexahydrohexaoxybenzol, $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$, $C_6H_6(OH_6) + 2H_2O$, ist höchstwahrscheinlich ein normaler Bestandteil des Menschenharns, wenn er sich darin auch nur in sehr geringer Menge vorfindet, nämlich nach Starkenstein zu etwa 0,08 %. Beim Diabetes soll Inosit in größerer Menge im Harne vorkommen. Inosit dürfte im Tierkörper weit verbreitet sein, und er ist bis jetzt unter Anderem in Gehirn, Leber, Leukocyten, Milz, Muskeln, Nieren und Nebennieren gefunden worden. Auch im Pflanzenreiche kommt Inosit weit verbreitet vor und findet sich besonders in unreifen Bohnen, Phaseolus vulgaris, und wird daher auch »Phaseomannit« genannt. Man trifft Inosit vorzugsweise in den sich entwickelnden Organen der Pflanzen. Er soll nach Starkenstein in den Organen junger Tiere in größerer Menge vorkommen als in denjenigen älterer Tiere. Nach diesen Tatsachen ist der Schluß berechtigt, daß Inosit nicht ein Auswurfsstoff des Stoffwechsels, sondern ein für die Zellen wichtiger Stoff ist.

Eigenschaften. Inosit kristallisiert aus Wasser unterhalb 50° mit 2 Mol. Kristallwasser in großen, farblosen, rhomboëdrischen Kristallen, oberhalb 50° in wasserfreien, drusenförmig vereinigten Nadeln vom Schmp. 217° (225°). Inosit wird auch von konzentrierter oder

[1]) Berichte d. Deutch. chem. Ges. 41, 1788 (1908).

verdünnter Essigsäure gelöst und aus derartigen Lösungen leichter in Kristallen erhalten, als aus rein wässerigen Lösungen. Das Kristallwasser entweicht bei 110° vollständig, ebenso bei längerem Liegen an der Luft, wobei die Kristalle undurchsichtig und milchweiß werden. Inosit ist bei 15° in 7,5 Teilen Wasser löslich; die wässerigen Lösungen schmecken ausgesprochen süßlich. In absolutem Alkohol und in Aether ist er unlöslich. Inosit löst zwar Kupferoxyd in alkalischer Lösung, reduziert es aber beim Kochen nicht; ebensowenig wird die Nylandersche Wismutlösung reduziert. Er vergärt nicht mit Hefe, kann aber mit Spaltpilzen in die Milchsäure- und Buttersäuregärung übergehen. Inosit verbindet sich nicht mit Phenylhydrazin. Verdünnte Salpetersäure verändert den Inosit nicht; im Ueberschusse angewandte konzentrierte Salpetersäure oxydiert Inosit zu Tetraoxychinon und Rhodizonsäure:



Inosit Tetraoxychinon Rhodizonsäure

Auf der Bildung von Rhodizonsäure mit starker Salpetersäure beruhen die Reaktionen, welche in der Regel zum Nachweise des Inosits dienen.

1. Scherersche Inositprobe. Verdampft man ein wenig Inosit mit konzentrierter Salpetersäure in einem Schälchen bis fast zur Trockene, versetzt den Rückstand mit etwas Ammoniak sowie einem Tropfen Chlorcalciumlösung und verdunstet von neuem vorsichtig zur Trockene, so erhält man einen rosenroten Rückstand von rhodizonsaurem Calcium.

2. Gallois' Probe. Verdunstet man eine Inositlösung in einem Porzellanschälchen bis fast zur Trockne und befeuchtet den Rückstand mit einem Tröpfchen Mercurinitratlösung, so bleibt beim Eindunsten ein gelblicher Rückstand, der bei etwas stärkerem Erhitzen eine mehr oder weniger dunkelrote Färbung annimmt. Beim Erkalten verschwindet diese Färbung wieder, um bei gelindem Erwärmen wieder zum Vorschein zu kommen.

Harnstoff, Harnsäure, Mannit, Milchzucker, Glykokoll, Glykogen, Taurin, Cystin geben diese Probe nicht, während sich Albuminstoffe rosa und Zucker schwarz färben. Diese beiden Stoffe dürfen also nicht zugegen sein.

3. Verdampft man Inosit mit konzentrierter Salpetersäure zur Trockene, löst den Rückstand in wenig Wasser auf und fügt dann 1 Tropfen Strontiumacetatlösung hinzu, so färbt sich die Lösung violett.

Nachweis des Inosits im Harn.

Zum sicheren Nachweis des Inosits im Harn muß er nach einem der beiden folgenden Verfahren zuerst daraus dargestellt werden.

1. Der Harn[1]) wird mit Bleizuckerlösung vollständig ausgefällt, abfiltriert, das Filtrat mit Bleiessig gekocht und dann 12 bis 24 Stunden stehen gelassen. Der so erhaltene Bleiessigniederschlag, welcher den ganzen Inosit des Harns enthält, wird nach dem Abfiltrieren und Auswaschen in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom gefällten Schwefelblei wird auf ein kleineres Volumen eingedampft und noch heiß mit dem 3- bis 4fachen Volumen heißen Alkohols versetzt; hierbei scheiden sich meist zähe oder flockige Massen aus, welche rasch abfiltriert werden. Nun läßt man das Filtrat 24 Stunden kalt, am besten in einem Eisschranke, stehen. Haben sich nach dieser Zeit Inositkristalle abgesetzt, so filtriert man sie ab und spült sie mit wenig kaltem Alkohol aus. Andernfalls versetzt man das klar gebliebene alkoholische Filtrat nach und nach bis zur bleibenden milchigen Trübung mit Aether und läßt es wiederum 24 Stunden in der Kälte stehen. Hierbei scheidet sich die ganze Menge des vorhandenen Inosits ab und zwar häufig in glänzenden Blättchen. Sie werden abfiltriert, mit kaltem Aether ausgewaschen, getrocknet und mit Hilfe der oben angeführten Reaktionen als aus Inosit bestehend charakterisiert.

2. Methode von Starkenstein[2]). Der mit Essigsäure schwach angesäuerte, eventuell vorher in der Siedehitze von Eiweiß befreite Harn wird erst mit Baryumnitrat, dann mit Silbernitrat vollständig ausgefällt und abfiltriert. Das aufgesammelte Filtrat[3]) wird zur Ausfällung der alkalischen Erden und des überschüssigen Silbers mit Natriumphosphat plus Natronlauge versetzt, dann wird wiederum abfiltriert. Das hierbei gewonnene Filtrat wird mit Essigsäure schwach angesäuert und mit neutralem Bleiacetat im geringen Ueberschusse ausgefällt. Aus dem Filtrat dieses Niederschlags fällt man mit Ammoniak plus basischem Bleiacetat den Inosit vollständig aus, filtriert den Niederschlag nach 12 bis 24 Stunden ab, spült ihn mit kaltem Wasser aus und zerlegt ihn unter Wasser mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfidniederschlage verdampft man auf dem Wasserbade zur Trockene, nimmt den Rückstand mit wenig Wasser auf, kocht die Lösung mit gut wirkender Blutkohle, verdampft das hierbei erhaltene, vollkommen farblose und klare Filtrat nach Zusatz von Eisessig fast zur Trockene, löst den Rückstand nochmals in wenig konzentrierter Essigsäure und fügt zur Lösung absoluten Alkohol oder besser Methylalkohol. Nach einiger Zeit kann man den auskristallisierten Inosit auf einem gewogenen Filter sammeln, mit Aether auswaschen, trocknen und wägen. Zur Identifizierung werden die angegebenen Inositproben ausgeführt; auch empfiehlt es sich den

[1]) Vorhandenes Eiweiß muß durch Koagulation in der Siedehitze bei Gegenwart von Essigsäure zuvor entfernt werden.

[2]) Zeitschr. f. spez. Pathol. und Therapie V. 378 (1908).

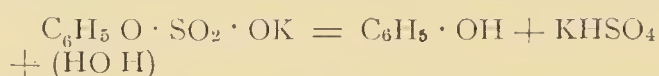
[3]) Soll der Inosit quantitativ bestimmt werden, so wird ein abgemessener aliquoter Teil des vorher gemischten Gesamtfiltrates, aus dessen Menge schließlich die Gesamtmenge an Inosit im abgemessenen Harn zu berechnen ist, mit Natriumphosphat versetzt und alsdann mit Natronlauge ausgefällt.

Schmelzpunkt (217°) zu bestimmen, falls Inosit in genügender Menge erhalten wurde.

B. Aromatische stickstoffreie Substanzen.

Phenole.

Phenol $C_6H_5 \cdot OH$ sowie o- und p-Kresol $C_6H_4(CH_3)(OH)$ (1,2 und 1,4) finden sich nicht im freien Zustande im Menschenharne vor, sondern in Form der Kaliumsalze ihrer gepaarten Schwefelsäuren, der Phenolschwefelsäure $C_6H_5 \cdot O \cdot SO_2 . OK$, und der o- und p-Kresolschwefelsäure $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot O \cdot SO_2 \cdot OK$ (1,2 und 1,4). Durch Kochen mit verdünnter Salzsäure, nicht aber mit Essigsäure, werden die Kaliumsalze der gepaarten Schwefelsäuren hydrolytisch gespalten:



$$C_6H_5 O \cdot SO_2 \cdot OK + (HO H) = C_6H_5 \cdot OH + KHSO_4$$

Die größte Menge der auf diese Weise aus dem Harne gewonnenen Phenole besteht aus p-Kresol, der kleinere Teil aus Phenol und o-Kresol. — Der Pferdeharn enthält Spuren von freiem p-Kresol. — Die Phenole entstehen bei der Fäulnis von Eiweiß und Tyrosin sowie beim Schmelzen dieser Stoffe mit Aetzkali. (E. Baumann). Auch Brenzkatechinschwefelsäure $C_6H_4(O\text{-}SO_2 \cdot OH)_2$ (1,2) findet sich häufig in sehr kleinen Mengen im Menschenharn vor, reichlicher nach Eingabe von Phenol oder Benzol. Im Pferdeharn, wie überhaupt im Pflanzenfresserharn, sind Brenzkatechinschwefelsäure wie überhaupt alle gepaarten Säuren in größerer Menge vorhanden.

Synthese der Aetherschwefelsäure im Tierkörper. G. Embden und K. Glaessner[1]) haben den experimentellen Beweis erbracht, daß die Leber das bei der Bildung der Aetherschwefelsäuren in erster Linie in Betracht kommende Organ ist.

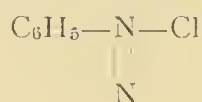
Geringe Mengen von Aetherschwefelsäure werden aber auch in der Niere und der Lunge gebildet. Die Muskulatur ist an der Synthese der Aetherschwefelsäuren nicht nennenswert beteiligt. Auch für den Darm konnte eine solche Beteiligung nicht nachgewiesen werden.

Phenol, $C_6H_5 \cdot OH$, kristallisiert in absolut reinem Zustande in langen, farblosen Prismen von charakteristischem Geruche, schmilzt bei 42°, siedet bei 180°, ist löslich in 15 Tln. Wasser von 20° und sehr leicht löslich in Alkohol, Aether, Chloroform und Eisessig. Es ist mit Wasserdämpfen leicht flüchtig. Phenol oder Carbolsäure wird synthetisch erhalten:

1. Durch Kochen von Diazobenzolsalzen, z. B. Diazobenzolchlorid[2]) mit Wasser:

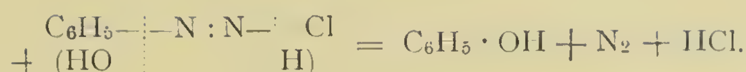
[1]) Hofmeister's Beiträge 1, 310 (1902).

[2]) Für Diazobenzolchlorid muß auch die Formel



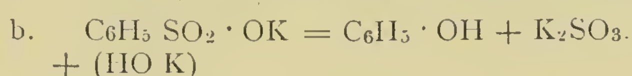
$$C_6H_5{-}\underset{\substack{| \\ N}}{N}{-}Cl$$

in Betracht gezogen werden.

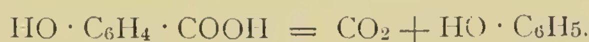


2. Durch Schmelzen von Benzolsulfosäure, vielmehr von derem Alkalisalz, mit Aetzkali oder Aetznatron in einer Silber- oder Nickelschale (b)[1]; da Benzolsulfosäure aus Benzol durch Erwärmen mit konzentrierter, besser rauchender Schwefelsäure entsteht (a), so ist der Weg gegeben, auf dem man vom Benzol zur Carbolsäure gelangen kann:

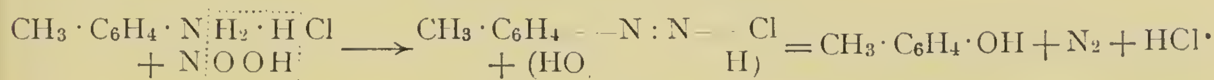




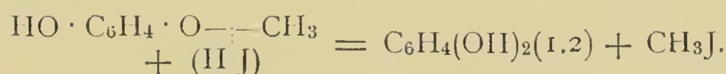
3. Durch Erhitzen der drei Oxybenzoësäuren mit Kalk; die Salicylsäure spaltet schon bei raschem Erhitzen für sich Kohlendioxyd ab, indem sie in Carbolsäure übergeht:



p-Kresol, $C_6H_4(CH_3)(OH)$, bildet bei 36° schmelzende Kristalle, verhält sich gegen Lösungsmittel ähnlich wie Phenol und wird auch analog wie dieses dargestellt, nämlich durch Kalischmelze der p-Toluolsulfosäure $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2 \cdot OH$ oder aus den p-Toluidin durch Diazotieren und Kochen des Diazosalzes mit Wasser:



Brenzkatechin oder o-Dioxybenzol, $C_6H_4(OH)_2$, wurde zuerst durch trockene Destillation von Catechu erhalten und entsteht beim Schmelzen vieler Harze mit Aetzkali. Es kristallisiert aus Wasser in prismatischen Nadeln, aus Benzol in Blättchen vom Schm. 104°, ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und Aether. Alkalische Brenzkatechinlösungen bräunen sich rasch an der Luft. Brenzkatechin wirkt reduzierend auf die Oxyde edler Metalle und auf Fehlingsche Lösung, aus der es beim Erwärmen Kupferoxydul abscheidet. — Brenzkatechin wird dargestellt durch Kochen von Guajakol, dem Brenzkatechinmonomethyläther, mit Jodwasserstoffsäure:



Nachweis der Phenole im Harn.

Man vermischt in einem geräumigen Glaskolben, der höchstens zu 1/3 seines Inhalts gefüllt sein darf, 200 bis 300 ccm Harn mit 30 bis 50 ccm konzentrierter Salzsäure — zur Spaltung der gepaarten Schwefelsäuren — und destilliert 50 bis 80 ccm ab. Der Destillationsrückstand dient zur Prüfung auf das, mit Wasserdämpfen nicht flüchtige Brenzkatechin und das Destillat zum Nachweis der flüchtigen Phenole. Das letztere wird mit Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt, dann wiederum destilliert, etwa 20 bis 30 ccm Destillat aufge-

[1] In der Technik werden derartige Schmelzen in eisernen Kesseln ausgeführt.

sammelt und dieses mit Hilfe der folgenden Reaktionen auf Phenol und Kresol geprüft:

1. Beim Erwärmen mit Millons Reagens färbt es sich rot oder gibt einen roten Niederschlag, falls größere Mengen von Phenol oder Kresol vorhanden sind.

2. Bromwasser im Ueberschusse zugesetzt, fällt einen gelben bis bräunlichen kristallinischen Niederschlag. — Phenol liefert hierbei vorzugsweise Tribromphenolbrom $C_6H_2Br_3 \cdot OBr$.

3. Verdünnte Eisenchloridlösung färbt violett bis schmutzig blau. Diese Probe ist nicht so empfindlich wie die unter 1 und 2 angegebenen Reaktionen.

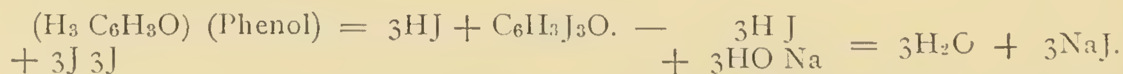
Zum Nachweise des Brenzkatechins wird der zuerst erhaltene Destillationsrückstand einige Male mit Aether ausgeschüttelt, die Aetherlösung in einem Scheidetrichter von der wässerigen Schicht getrennt, dann die erstere mit Sodalösung geschüttelt, wiederum getrennt, durch ein trockenes Filter gegossen und aus ihr der Aether abdestilliert. Den Rückstand dieser Aetherlösung löst man in etwa 5 ccm Wasser, filtriert und prüft das Filtrat mit Hilfe der beiden folgenden Reaktionen auf Brenzkatechin:

1. Den einen Teil des Filtrats versetzt man mit einigen Tröpfchen Eisenchloridlösung: Brenzkatechin bewirkt eine Grünfärbung, die auf Zusatz von Natriumcarbonat in Violett übergeht.

2. Den zweiten Teil des Filtrats versetzt man mit einigen Tropfen Silbernitratlösung und überschüssigem Ammoniak; eine auftretende Schwarzfärbung durch reduziertes Silber zeigt dann Brenzkatechin an.

Quantitative Bestimmung der Phenole im Harne nach Kossler und Penny[1], in der Ergänzung von C. Neuberg[2].

Diese Bestimmung des Phenols und Kresols im Harne beruht auf der folgenden, von J. Messinger und G. Vortmann[3]) aufgefundenen Reaktion. Versetzt man eine mäßig erwärmte alkalische Phenollösung mit überschüssigem Jod, so fällt unter Verbrauch von 6 Atomen Jod auf 1 Molekül Phenol ein nicht kristallinischer, dunkelrot gefärbter Niederschlag aus:



$$\frac{(H_3\,C_6H_3O)\ (\text{Phenol})}{+\ 3J\ 3J} = 3HJ + C_6H_3J_3O. \quad \frac{3H\,J}{+\ 3HO\,Na} = 3H_2O + 3NaJ.$$

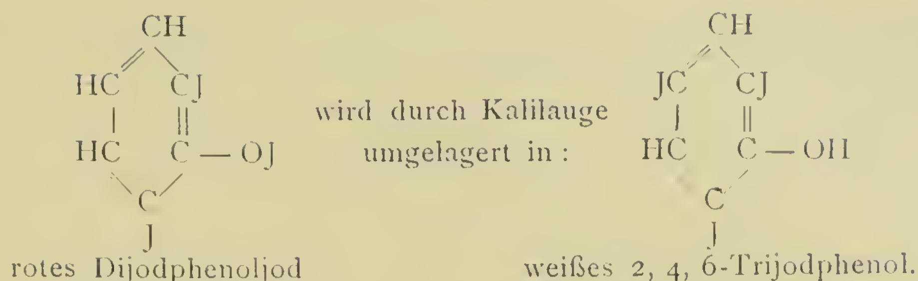
Beim Kochen mit Kalilauge geht dieser Niederschlag mit rotbrauner Farbe in Lösung, und beim Ansäuern dieser Lösung mit verdünnter Schwefelsäure fällt dann weißes, bei 154—156° schmelzendes, 2, 4, 6-Trijodphenol aus. Nach Messinger und Vortmann besteht der zuerst erhaltene rote Niederschag aus Dijodphenoljod, das durch Kalilauge in das stabilere, isomere Trijodphenol umgelagert wird:

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 17, 117 (1893).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 123 (1899).

[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 22, 2312 (1889) und 23, 2753 (1890).



rotes Dijodphenoljod weißes 2, 4, 6-Trijodphenol.

Das im Harndestillate sich vorfindende p-Kresol verhält sich gegen eine alkalische Jodlösung analog wie Phenol, indem beim Ansäuern Trijodkresol ausgefällt wird. C. Neuberg (l. c.) hat gefunden, daß bei der Destillation eines jeden Harns, besonders aber eines zuckerhaltigen Harnes, durch Einwirkung der verdünnten Schwefelsäure auf die Kohlenhydraten desselben jodbindende Substanzen ins Destillat übergehen können. Zur Entfernung dieser letzteren wird das erhaltene Destillat mit Bleiacetat und Natronlauge erhitzt, Bedingungen, unter welchen die Phenole nicht verändert werden.

Ausführung. Man dampft 500 ccm Harn in einer flachen Schale auf dem Wasserbade auf etwa 100 ccm ein, wobei vorhandenes Aceton vollständig entweicht, bringt den eingedampften Harn ohne Verlust in einen geräumigen Destillationskolben, fügt soviel konzentrierte Schwefelsäure hinzu, daß der eingedampfte Harn ungefähr 5 Prozent der ursprünglichen Harnmenge davon enthält und destilliert ab. Wenn der Kolbeninhalt zu stoßen beginnt, unterbricht man die Destillation für einen Augenblick, bringt Wasser in den Kolben, destilliert weiter und wiederholt dieses Hinzufügen von Wasser und darauffolgendes Abdestillieren 5 mal. Das Destillat wird zur Bindung von etwa vorhandener Ameisensäure und salpetriger Säure mit 1 bis 2 g Calciumcarbonat tüchtig durchschüttelt, abermals destilliert und die Destillation nach jeweiligem Zufügen von Wasser zum Rückstande 4- bis 5 mal wiederholt. Die hierbei aufgesammelten Destillate werden in einem 2-Literkolben, zur Entfernung der aus den Kohlehydraten des Harns bei der Destillation mit Schwefelsäure entstandenen jodbindenden Substanzen, mit einer Auflösung von 1 g Aetznatron und 6 g neutralem Bleiacetat versetzt und etwa 15 Minuten lang auf einem lebhaft siedenden Wasserbade erhitzt. Hierbei löst sich ein Teil des Bleioxyds in den Phenolen zu basischen Bleiphenolaten, während die leicht flüchtigen, jodbindenden Aldehyde entweichen. Zur vollständigen Entfernung der letzteren erhitzt man den Kolbeninhalt noch kurze Zeit am absteigenden Kühler auf freier Flamme, bis einige ccm des Destillats ammoniakalische Silbernitratlösung nicht mehr reduzieren, was gewöhnlich schon nach 5 Minuten langem Destillieren der Fall ist. Ein allzu langes Erhitzen ist zu vermeiden, weil sonst die Bleiphenolate hydrolysiert werden und die Phenole sich verflüchtigen könnten. Man säuert nun den Kolbeninhalt mit verdünnter Schwefelsäure stark an und destilliert die Phenole, unter zweimaliger Ergänzung der Flüssigkeitsmenge durch Wasser, ab. Das Destillat wird in einer starkwandigen, gut schließenden Glasstöpselflasche erst mit 1/10 n-Natronlauge in bedeutendem Ueberschusse versetzt, durch

Eintauchen in heißes Wasser erwärmt, dann mit $^1/_{10}$ n-Jodlösung, und zwar nimmt man etwa 20 ccm mehr Jodlösung, als man $^1/_{10}$ n-Natronlauge genommen hat. Nun wird die Flasche verschlossen und tüchtig geschüttelt. Das Gemisch muß nach Zusatz der Jodlösung stark braun gefärbt sein. Nach dem Erkalten des Gemisches wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das freie, ungebundene Jod mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung, zuletzt unter Zusatz von Stärkelösung, zurücktitriert.

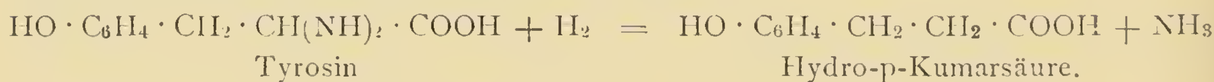
Berechnung. Nach der oben aufgestellten Gleichung entsprechen 6 Atome Jod 1 Molekül Phenol, oder 1 Atom Jod entspricht $^1/_6$ Molekül Phenol = $^1/_6 C_6H_5OH$ = 15,67. 1000 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung, welche $^1/_{10}$ Grammatom freies Jod gelöst enthalten, zeigen somit 1,567 g Phenol an; analog leitet sich der Wert für p-Kresol zu 1,8017 ab.

1 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung entspricht somit 1,567 mg Phenol oder 1,8017 mg Kresol.

Die beim Zurückmessen der überschüssigen Jodlösung verbrauchte Anzahl ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung ist somit von der angewandten $^1/_{10}$ n-Jodlösung abzuziehen, um in ccm die Menge der letzteren zu erfahren, die von den Phenolen des abgemessenen Harns gebunden wurde. — Die Titration der Phenole nach Messinger und Vortmann gibt einen richtigen Wert, wenn auf 1 Mol. des Phenols mindestens 3 Mol. Aetzkali oder Aetznatron kommen.

Aromatatische Oxysäuren.

p-Oxyphenylessigsäure $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot COOH$ (1,4) und p-Oxyphenylproprionsäure oder Hydro-p-Kumarsäure $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ (1,4) hat E. Baumann[1]) als Fäulnisprodukte des Tyrosins erhalten, als dieses mit faulem Pankreas 2 Tage lang im Brutofen zusammengebracht wurde:



$$HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH(NH)_2 \cdot COOH + H_2 = HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + NH_3$$

Tyrosin — Hydro-p-Kumarsäure.

Baumann hat dann die beiden aromatischen Oxysäuren als normale Bestandteile des Harns von Menschen und Tieren aufgefunden. In pathologischen Harnen finden sie sich in reichlicherer Menge vor.

Zur Isolierung der beiden Säuren müssen größere Mengen, nämlich 50—100 l frischer, normaler menschlicher Harn verarbeitet werden.

p-Oxyphenylessigsäure kristallisiert aus Wasser in prismatischen, meist flachen Nadeln vom Schmp. 148°, ist im Wasser ziemlich leicht, in Alkohol und Aether leicht löslich.

p-Oxyphenylpropionsäure kristallisiert aus Wasser in farblosen, monoklinen, in Wasser, Alkohol und Aether leicht löslichen, bei 125° schmelzenden Kristallen. Beide Säuren geben als einwertige Phenole die Millonsche Probe.

Nachweis im Harn.

Man erwärmt 200 ccm oder mehr Harn, zur Entfernung der flüchtigen Phenole, mit Salzsäure auf dem Wasserbade einige Zeit, schüttelt

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 12, 1450 (1879) und 13, 279 (1880).

nach dem Erkalten einige Male mit Aether aus und dann den erhaltenen Aetherauszug wiederholt mit kalter Sodalösung. Die letztere nimmt die aromatischen Oxysäuren auf, während etwa noch vorhandene freie Phenole im Aether gelöst bleiben. Die Sodalösung säuert man alsdann mit verdünnter Schwefelsäure an, schüttelt wiederum mit Aether aus, verdunstet den filtrierten Aetherauszug, löst den Rückstand in wenig Wasser und erwärmt die filtrierte klare Lösung mit einigen Tropfen Millonschen Reagens. Bei Vorhandensein der beiden Säuren färbt sich die Lösung hierbei tiefrot.

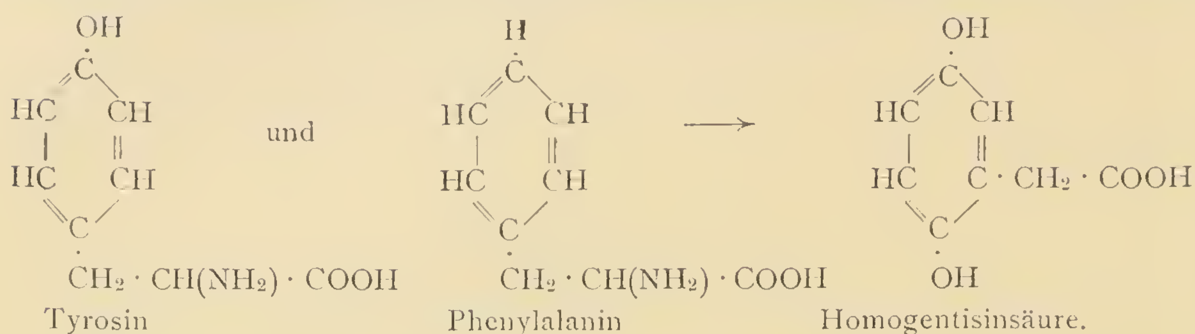
Homogentisinsäure.

Homogentisinsäure, Dioxyphenylessigsäure, $C_8H_8O_4$ = $C_6H_3(OH)_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ (1, 4, 5), ist identisch mit dem sogenannten Alkapton des Harns: Alkaptonurie. Die Homogentisinsäure ist diejenige Substanz, welche bei Alkaptonurie dem Harn die Eigenschaft erteilt, sich an der Luft, besonders bei Alkalizusatz, braun bis schwarz zu färben. Die Menge der bei Alkaptonurie in 24 Stunden mit dem Harn ausgeschiedenen Homogentisinsäure beträgt in der Regel 3—7 g, nur in seltenen Fällen mehr. Ein Alkaptonharn reduziert alkalische Kupferoxydlösung, also Fehlingsche Lösung, schon bei schwachem Erwärmen und ammoniakalische Silbernitratlösung schon in der Kälte. Dagegen gibt er nicht die Nylandersche Wismutprobe. Eingabe von Tyrosin vermehrt bei Alkaptonurikern die Menge der abgesonderten Homogentisinsäure, wie E. Baumann und Wolkow[1]) zuerst gefunden und andere Forscher dann bestätigt haben. W. Falta und L. Langstein[2]) haben später nachgewiesen, daß nicht nur das Tyrosin $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ (1,4), sondern auch das l-Phenylalanin $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ eine der Muttersubstanzen der Homogentisinsäure ist, indem im Körper eines Alkaptonurikers von 5,0 g eingegebenen l-Phenylalanin 4,466 g in Homogentisinsäure übergingen; somit kamen bei diesem Versuche 89,32 % des aktiven l-Phenylalanins als Homogentisinsäure zur Ausscheidung. Als an Stelle des optisch aktiven das racemische Phenylalanin verabreicht wurde, gingen im Organismus desselben Alkaptonurikers nur 50 % in Homogentisinsäure über. — m- und o-Tyrosin liefern im Körper des Alkaptonurikers keine Homogentisinsäure. (Blum.)

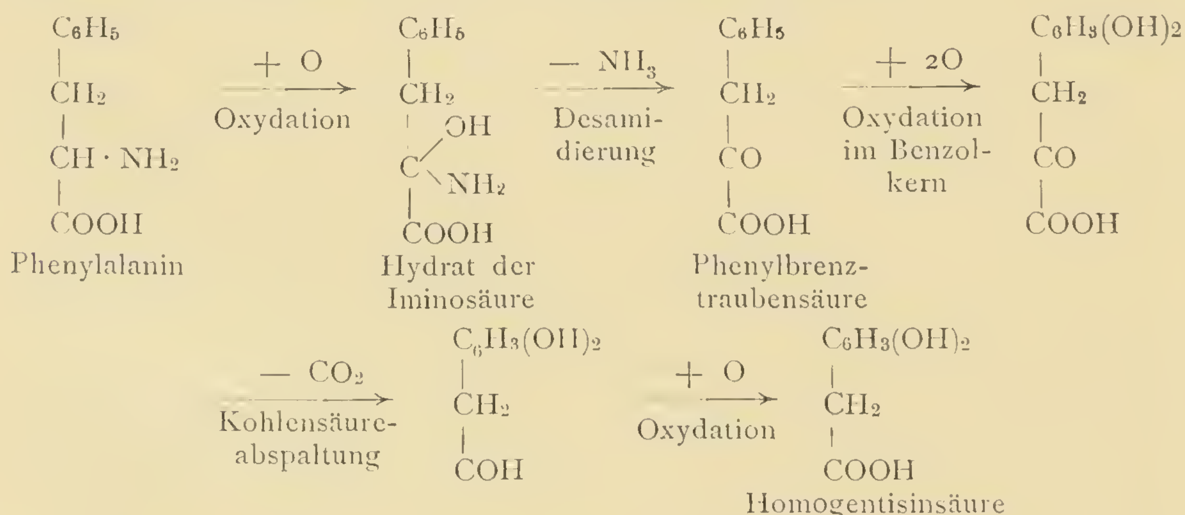
Die Homogentisinsäure entsteht höchstwahrscheinlich als ein Spaltungsprodukt beim Eiweißstoffwechsel. Aber nicht alle Eiweißkörper liefern im Organismus des Alkaptonurikers die gleiche Menge Homogentisinsäure; je reicher die Eiweißkörper an Tyrosin und Phenylalanin sind, umso mehr Homogentisinsäure wird im Körper des Alkaptonurikers gebildet. (Falta.) Auch wenn die beiden Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin mit anderen Aminosäuren verbunden, in Form von Polypeptiden eingeführt werden, wie von Glycyl-l-Tyrosin, racemischem

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 228 (1891).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 513 (1902/1903).

Glycyl-Phenylalanin, racemischem Alanyl-Phenylalanin, liefern sie eine ihrem Gehalte an Tyrosin oder Phenylalanin entsprechende Menge Homogentisinsäure. (E. Abderhalden, B. Bloch, P. Rona[1]). Zur besseren Orientierung mögen die Konstitutionsformeln der in Frage kommenden drei Verbindungen folgen:



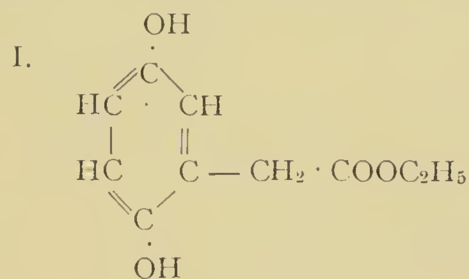
Bemerkenswert ist auch die von den genannten Autoren aufgefundene Tatsache, daß Glycyl-l-Tyrosin auch bei subkutaner Zufuhr die Homogentisinsäurebildung vermehrt. — Da die Homogentisinsäure, wenn sie in nicht zu großen Mengen einverleibt wird, vom gesunden menschlichen Organismus verbrannt wird, von dem des Alkaptonurikers aber nicht, so dürfte die Alkaptonurie auf eine Anomalie des Eiweißstoffwechsels zurückzuführen sein. Die Homogentisinsäurebildung dürfte einen Defekt in dem endgültigen Eiweißabbau und speziell dem Abbau der aromatischen Substanzen darstellen. — Von verschiedenen Forschern wurde die Tatsache aufgefunden, daß im Körper des Alkaptonurikers nur aromatische Säuren mit einer dreigliedrigen Seitenkette und einem Substituenten in α-Stellung (NH_2, CO) wie p-Tyrosin, Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH$ in Homogentisinsäure übergehen können. Untersuchungen von O. Neubauer und K. Fromherz[2]) aus der letzten Zeit sprechen zu Gunsten der Auffassung, daß sich die Homogentisinsäure aus Phenylalanin in der folgenden Weise bildet:



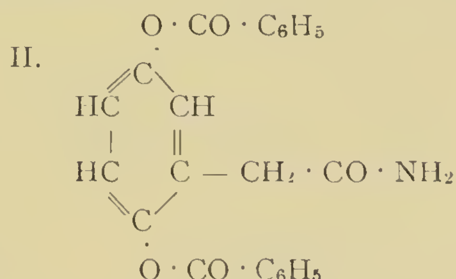
Eigenschaften. Homogentisinsäure kristallisiert in Prismen mit 1 Mol. Wasser, das unter Undurchsichtigwerden der Kristalle

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 435 (1907).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 326 (1910/11).

schon beim Liegen an der Luft entweicht. Die Säure ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und Aether, fast unlöslich in Benzol und Chloroform, schmilzt bei 146—147° und geht beim Trocknen über 100° in ihr in kurzen Prismen kristallisierendes, bei 191° schmelzendes Lacton (s. unten) über. Die wässerige, besonders die mit Ammoniak oder Alkalilauge versetzte Lösung der Homogentisinsäure färbt sich an der Luft braun bis schwarz. Das Verhalten zur Fehlingschen Lösung und ammoniakalischem Silbernitrat ist bereits oben angeführt; ebenso, daß Homogentisinsäure die alkalische Nylandersche Wismutlösung nicht reduziert. Eisenchlorid färbt die wässerige Lösung der Homogentisinsäure noch bei einer Verdünnung von 1:4000 vorübergehend blau. Kocht man die Säure mit konzentrierter Eisenchloridlösung, so tritt der Geruch nach Chinon auf. Millons Reagens färbt gelb und liefert einen beim Erhitzen sich ziegelrot färbenden Niederschlag. Von den Salzen der Homogentisinsäure ist ihr Bleisalz $(C_8H_7O_4)_2Pb + 3H_2O$ besonders bemerkenswert, da seine Darstellung bei der Abscheidung der Säure aus Harn gute Dienste leistet; es ist in 675 Tln. Wasser von 20° löslich, verliert beim Liegen über Schwefelsäure im Vacuum sein Kristallwasser und schmilzt dann bei 214—215°. — Der Aethylester der Homogentisinsäure (I) entsteht schon beim Erhitzen einer Lösung der Säure in alkoholhaltigem Aether und bildet Kristalle, die in kaltem Wasser schwer, in Aether und in Alkohol aber sehr leicht löslich sind und die bei 119—120° schmelzen. — Beim Schütteln einer Lösung der Homogentisinsäure in wässerigem Ammoniak mit Benzoylchlorid und Natronlauge fällt das Amid der Dibenzoylhomogentisinsäure (II) aus. Aus Alkaptonharn erhält man die gleiche Verbindungen auch ohne Zusatz von Ammoniak:



Homogentisinsäureäthylester.

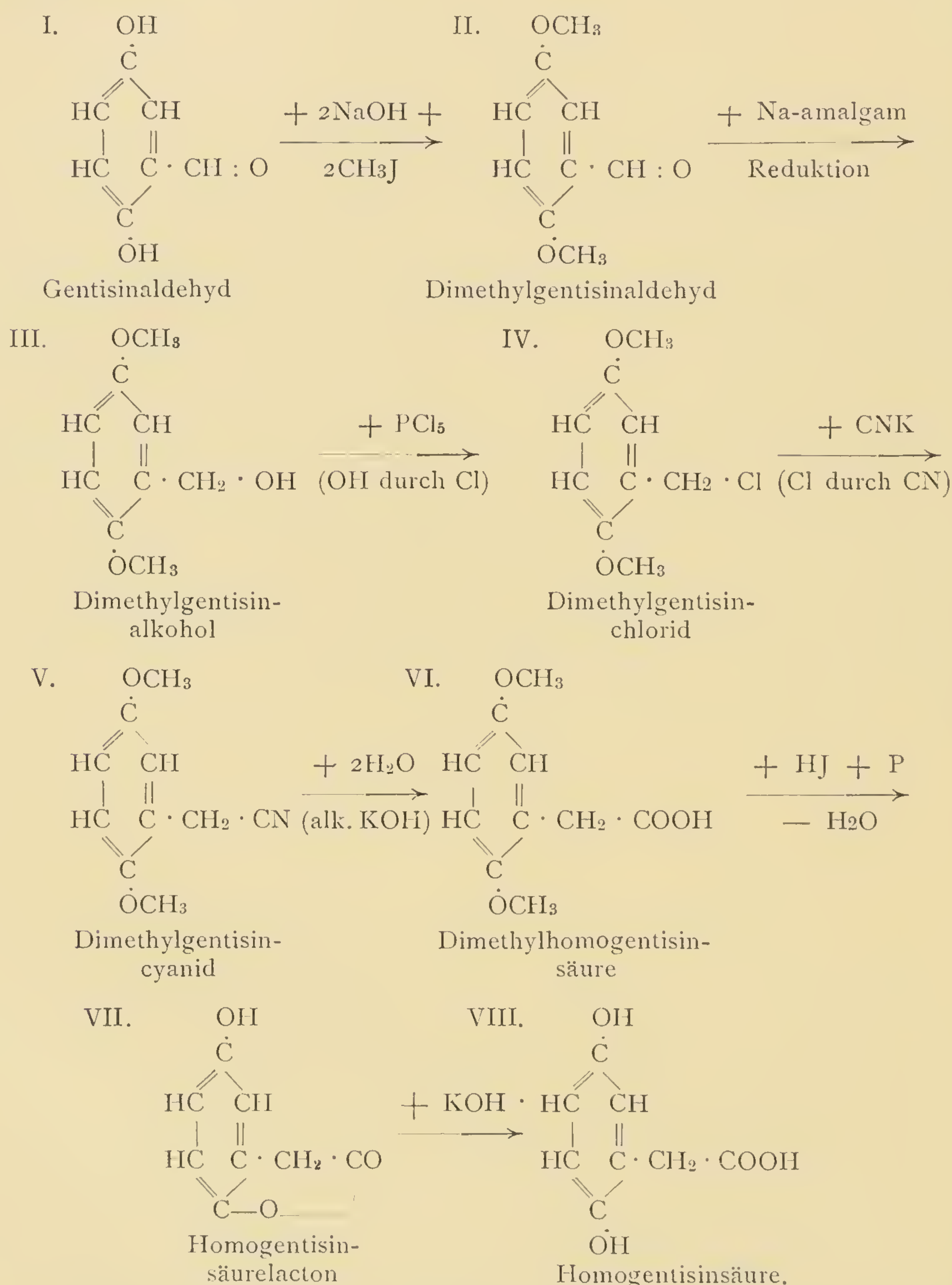


Amid der Dibenzoylhomogentisinsäure.

Synthese der Homogentisinsäure nach E. Baumann und S. Fränkel[1]). Der nach der Methode von Tiemann-Reimer aus Hydrochinon, Chloroform und Kalilauge darstellbare Gentisinaldehyd (I) wird durch Erhitzen mit Aetznatron und Jodmethyl in seinen Dimethyläther, den Dimethylgentisinaldehyd (II) übergeführt und dieser in alkoholischer Lösung mit Natriumamalgam zum zugehörigen primären Alkohol, dem Dimethylgentisinalkohol (III) reduziert. Letzterer wird in Benzollösung mit der berechneten Menge Phosphorpentachlorid in Dimethylgentisinchlorid (IV) und dieses

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 219 (1895).

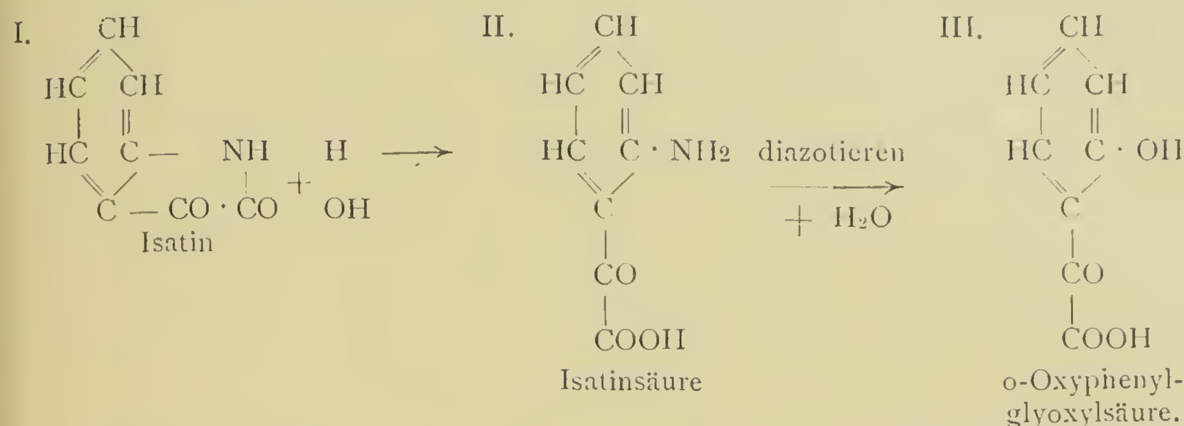
mit einer wässerigen Cyankaliumlösung in das Dimethylgentisincyanid (V) verwandelt, welches mit alkoholischer Kalilauge Dimethylhomogentisinsäure (VI) lieferte. Diese Säure war identisch mit der von E. Baumann und Wolkow aus der Homogentisinsäure des Harns dargestellten dimethylierten Säure. Durch Erhitzen der letzteren mit rauchender Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor wurde das Lacton der Homogentisinsäure (VII) und aus diesem durch Einwirkung von Alkalilauge die Homogentisinsäure (VIII) selbst erhalten.



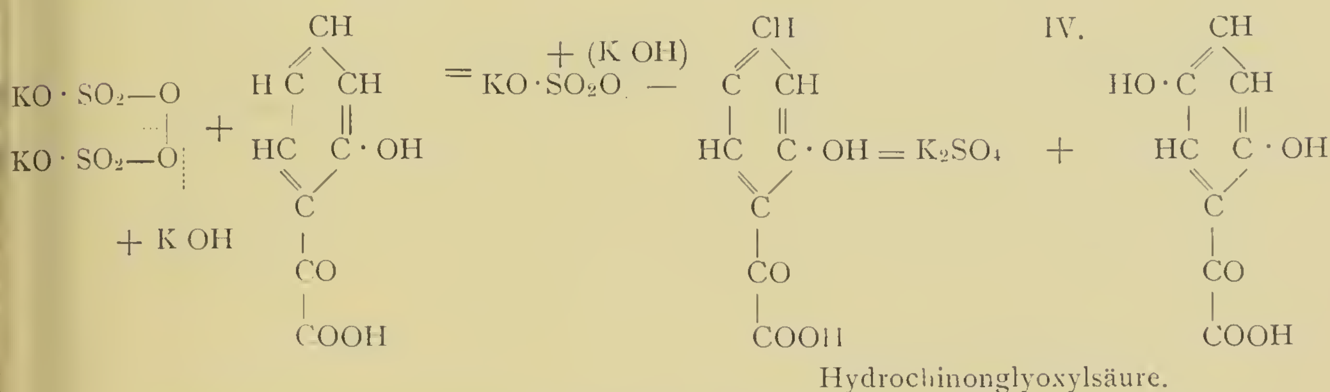
2. Nach O. Neubauer und L. Flatow[1]). Isatin (I) liefert mit festen Alkalien die Isatinsäure (II) oder o-Aminophenylglyoxyl-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 393 (1907).

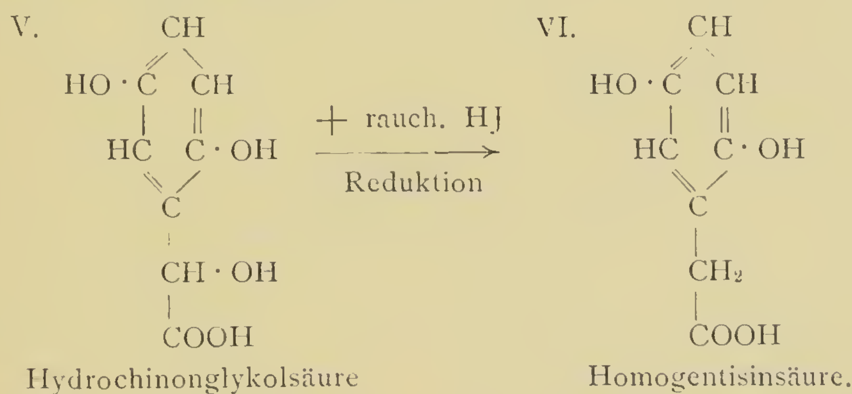
säure, aus der sich durch Diazotieren und Erwärmen des Diazoproduktes mit Wasser die o-Oxyphenylglyoxylsäure (III) darstellen läßt:



Durch Oxydation der o-Oxyphenylglyoxylsäure mit Kaliumpersulfat gelingt die Umwandlung derselben in die Hydrochinonglyoxylsäure (IV):



Durch Natriumamalgam wird die Hydrochinonglyoxylsäure zur Hydrochinonglykolsäure (V) reduziert, die durch Kochen mit rauchender Jodwasserstoffsäure in Hydrochinonessigsäure = Homogentisinsäure (VI) übergeht:



Die Homogentisinsäure bildet sich auch direkt durch Reduktion der Hydrochinonglyoxylsäure.

Darstellung der Homogentisinsäure aus Alkaptonharn.

Der Alkaptonharn ist frisch gelassen meist schon dunkler wie normaler Harn, dunkelt aber beim Stehen an der Luft stark nach, besonders, wenn er mit einer Spur Natronlauge oder Ammoniak versetzt ist, und wird schließlich dunkelbraun und sogar schwarz. Ein

Alkaptonharn reduziert Fehlingsche Lösung schon bei schwachem Erwärmen, ammoniakalisches Silbernitrat sofort in der Kälte, aber er reduziert nicht die alkalische Wismutlösung (Nylanders Reagens). Wenn ein Harn ein derartiges Verhalten zeigt, enthält er wahrscheinlich Homogentisinsäure. Man sucht dann die Säure selbst aus dem fraglichen Harne nach einem der folgenden Verfahren abzuscheiden.

1. Nach E. Baumann (l. c.) säuert man den Harn mit verdünnter Schwefelsäure an, indem man auf 1 Liter Harn 75 ccm einer aus 1 Volumen konzentrierter Säure und 12 Volumen Wasser hergestellten Säure verwendet, dampft auf dem Wasserbade auf den zehnten Teil ein und schüttelt viermal mit dem doppelten Volumen Aether aus. Die filtrierten Aetherauszüge werden abdestilliert, der zurückbleibende Syrup wird in ca. 50 ccm Wasser gelöst, die filtrierte Lösung zum Sieden erhitzt, mit basischem Bleiacetat versetzt und rasch kochend heiß filtriert. Beim Erkalten kristallisiert das in kaltem Wasser schwer lösliche homogentisinsaure Blei $(C_8H_7O_4)_2 Pb + 3 H_2O$ in Nadeln und Prismen aus.

2. Nach Garrod[1]) erhitzt man den Harn zum Kochen, fügt auf je 1000 ccm Harn mindestens 6 g zerriebenes Bleiacetat hinzu, filtriert, sobald das letztere gelöst ist, heiß ab und läßt das Filtrat an einem kühlen Orte, am besten in einem Eisschranke, 20—24 Stunden stehen; hierbei scheidet sich homogentisinsaures Blei aus.

Zur Darstellung der freien Homogentisinsäure zerteilt man das fein zerriebene Bleisalz unter Wasser, erhitzt zum Sieden, zerlegt es heiß durch Schwefelwasserstoff und dunstet das Filtrat vom ausgeschiedenen Schwefelblei erst auf dem Wasserbade, dann über Schwefelsäure im Vacuum zum Syrup ein. — Oder zweckmäßiger verteilt man das Bleisalz im fein zerriebenen Zustande in Aether und zerlegt es ebenfalls durch Schwefelwasserstoff; beim Eindunsten der abfiltrierten Aetherlösung erhält man die zurückbleibende Homogentisinsäure in nahezu farblosen Kristallen.

Quantitative Bestimmung der Homogentisinsäure im Alkaptonharn nach E. Baumann.

Diese Methode, eine Titration der Homogentisinsäure mit $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung, beruht auf der Reduktion einer ammoniakalischen Silbernitratlösung durch die Säure.

Man versetzt in einem Kölbchen 10 ccm des Alkaptonharns mit 10 ccm Ammoniakflüssigkeit von 8% NH_3 (nach Garrod und Hurtley), läßt sofort aus einer Bürette 2—3 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung zufließen, schüttelt um und läßt 5 Minuten stehen. Nun werden 5 Tropfen Chlorcalciumlösung (1 : 10) und 10 Tropfen Ammoniumcarbonatlösung hinzugefügt; nach dem Umschütteln wird filtriert und das bräunlich gefärbte, aber ganz klare Filtrat mit Silbernitrat geprüft. Tritt dabei so-

[1]) Journ. of Physiology 23, 512.

fort wieder eine starke Abscheidung von metallischem Silber ein, so wird ein zweiter Versuch angesetzt und gleich eine größere Menge, die doppelte Menge $^1/_{10}$ n-Silberlösung zu der Mischung von je 10 ccm Harn und Ammoniakflüssigkeit gebracht. Kennt man schon annähernd die zur Oxydation notwendige Menge $^1/_{10}$ Silbernitratlösung, so verwendet man zur Erkennung der Endreaktion die Prüfung mit Salzsäure. Die Nähe der Endreaktion gibt sich dadurch zu erkennen, daß die tiefbraune Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure eine lichtrote Farbe annimmt. Das Ende der Reaktion ist erreicht, wenn das Filtrat vom Silberniederschlag beim schwachen Ansäuern mit verdünnter Salzsäure eine gerade noch sichtbare Trübung von Chlorsilber annimmt. Man findet diesen Endpunkt der Reaktion sehr scharf, wenn man den Versuch einige Male, 4—6mal, wiederholt. — Sind mehr als 8 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung auf 10 ccm Harn erforderlich, so sind bei Wiederholung des Versuchs statt 10 ccm 20 ccm Ammoniakflüssigkeit erforderlich.

Berechnung. 2,60 bis 2,65 gr metallisches Silber werden aus der ammoniakalischen Silbernitratlösung durch 1 gr wasserfreie Homogentisinsäure reduziert; diese Menge Silber ist in 240—245 ccm der $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung enthalten:

Somit zeigt 1 ccm $^1/_{10}$ n-Silbernitrat $\frac{1}{242,5} = 0,004124$ g Homogentisinsäure an.

2. Stickstoffhaltige Substanzen.

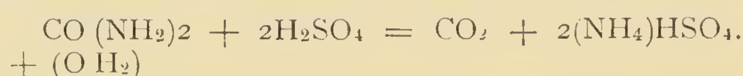
Der Gesamtstickstoff des Harns.

Die sämtlichen stickstoffhaltigen Substanzen des Harns sind im wesentlichen Abbau -oder Zerfallsprodukte der Eiweißstoffe. Ihre Gesamtmenge schwankt daher in erster Linie mit der Eiweißmenge, welche mit der Nahrung aufgenommen und resorbiert wird. Fällt das Körpereiweiß in größerer Menge dem Zerfall anheim, wie dies bei verschiedenen Krankheiten, bei hohem Fieber, bei Carcinom und der Zuckerharnruhr der Fall ist, oder werden dem Körper Protoplasmagifte einverleibt, so ist die Stickstoffausscheidung unter Umständen außerordentlich gesteigert. Bemerkenswert ist, daß angestrengte Muskelarbeit ohne Einfluß auf die Stickstoffausscheidung sein soll. — Ein gesunder erwachsener Mann scheidet bei gemischter Kost und unter normalen Verhältnissen in 24 Stunden 10 bis 16 g Stickstoff mit dem Harn aus. Nimmt man als durchschnittliche Tagesmenge für den Harn 1500 ccm an, so enthält also der normale Menschenharn abgerundet 0,7 bis 1,1% Stickstoff. Befindet sich der Mensch im Hungerzustande, so kann die Stickstoffausscheidung außerordentlich stark zurückgehen. — Andrerseits kann sie im Fieberzustande durch Einschmelzung von Körpereiweiß so sehr gesteigert werden wie nach einer reichlichen Zufuhr von eiweißreicher Nahrung. Alle Protoplasmagifte bedingen eine bedeutende Steigerung der Stickstoffausfuhr; zu den Protoplasmagiften gehören unter anderen Arsen, Antimon, Phosphor, Antifebrin, Chinin, Salicylsäure

Jodothyrin und somit auch die Schilddrüse und ihre verschiedenen Präparate.

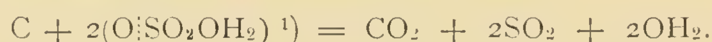
Die Bestimmung des gesamten Stickstoffs nach Kjeldahl.

Für die Bestimmung des gesamten Stickstoffes im Harne arbeitet man seit 20 Jahren fast ausschließlich nach der vortrefflichen Methode von Kjeldahl, die neben ihrer allgemeinen Anwendbarkeit und großen Zuverlässigkeit noch den Vorzug hat, daß sie mit Hilfe einer einfachen Apparatur ausgeführt werden kann und dabei nicht allzu viel Zeit beansprucht. — Die Methode besteht im wesentlichen darin, daß der Harn mit konzentrierter Schwefelsäure bei Gegenwart eines Katalysators gekocht wird. Die Schwefelsäure wirkt unter diesen Bedingungen auf einige Substanzen des Harns wie den Harnstoff hydrolytisch spaltend, welch letzterer glatt zu Kohlensäure und Ammoniak hydrolysiert wird, das dann mit dem großen Ueberschusse an konzentrierter Schwefelsäure saures schwefelsaures Ammonium bildet:



$$CO(NH_2)2 + 2H_2SO_4 = CO_2 + 2(NH_4)HSO_4. \\ + (O\,H_2)$$

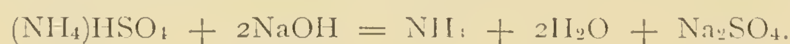
Andrerseits wirkt die konzentrierte Schwefelsäure auf viele organische Substanzen wasserentziehend und zunächst verkohlend, dann aber auch oxydierend auf die kohligen Bestandteile, indem die Schwefelsäure selbst zu schwefliger Säure reduziert wird:



$$C + 2(O|SO_2OH_2)^{1)} = CO_2 + 2SO_2 + 2OH_2.$$

Die gebildete schweflige Säure reduziert dann die stickstoffhaltige Substanz zu Ammoniak zum geringen Teil auch zu flüchtigen Aminbasen. Es mag sein, daß der Stickstoff auch ohne Einwirkung der schwefligen Säure direkt als Ammoniak austritt und in saures schwefelsaures übergeführt wird.

Die organische Substanz des Harns wird durch kochende konzentrierte Schwefelsäure allein nur äußerst langsam oxydiert. Man kann aber die Oxydation dadurch beschleunigen, daß man Kaliumsulfat zusetzt, wodurch der Siedepunkt der Schwefelsäure bedeutend erhöht wird, oder aber durch Zusatz eines Katalysators. Im letzteren Sinne wirken Kupfersulfat, metallisches Quecksilber und Quecksilberverbindungen. — Ist die Oxydation der organischen Substanz beendigt, so destilliert man die erhaltene schwefelsaure Lösung, welche nun den gesamten Stickstoff des Harns als saures schwefelsaures Ammonium enthält, mit überschüssiger Natron- oder Kalilauge, läßt das übergehende Ammoniak von einem Ueberschusse von $^1/_5$ n-Oxalsäure oder $^1/_5$ n-Schwefelsäure absorbieren und mißt den Ueberschuß der Säure mit $^1/_5$ n-Lauge zurück.



$$(NH_4)HSO_4 + 2NaOH = NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4.$$

a) Mit Kupfersulfat als Katalysator.

Erfordernisse. 1. Stickstoffreie konzentrierte Schwefelsäure. 2. Reines kristallisiertes Kupfersulfat. 3. Reines Kaliumsulfat. 4. Salpetersäurefreie Kali- oder

1) SO_4H_2 kann geschrieben werden (OSO_2OH_2).

Natronlauge, die ca. 25%ig ist. 5. Siedesteinchen, nämlich Tonstückchen oder Bimssteinstücke oder granuliertes Zink. 6. $^1/_5$ n-Oxalsäure oder $^1/_5$ n-Schwefelsäure. 7. $^1/_5$ n-Kalilauge oder $^1/_5$ n-Natronlauge. 8. Rosolsäurelösung. 0,5 g reine Rosolsäure werden in 50 ccm Weingeist gelöst, dann noch 50 ccm Wasser zugefügt.

Ausführung. Man bringt 10 ccm mit einer Pipette oder Bürette abgemessenen Harn in einen geräumigen Kjeldahlkolben (Fig. 10), fügt 10 ccm in einem Meßzylinderchen[1]) abgemessene konzentrierte Schwefelsäure, sowie ein erbsengroßes Stück Kupfervitriol hinzu und erhitzt nun den schief liegenden Kolben (vergl. Abbildung) auf einem Drahtnetze zunächst über kleiner Flamme, bis das zu Beginn des Kochens auftretende starke Schäumen nachgelassen hat. Man setzt jetzt noch 5 g Kaliumsulfat hinzu und kocht weiter und stärker, bis die Flüssigkeit vollkommen klar geworden ist und eine grünliche Färbung angenommen hat, was bei lebhafterem Kochen meist in 20 bis 25 Minuten erreicht ist. Zur Beendigung der Oxydation von etwa noch vorhandener organischer Substanz kocht man noch weitere 10 Minuten. Man bringt nun das erkaltete Reaktionsgemisch im Kjeldahlkolben mit ca. 20 ccm Wasser ohne Verlust, nämlich durch 4 bis 6maliges Nachspülen mit kleinen Mengen Wasser, in einen 800 ccm fassenden Destillationskolben aus Jenaer Glas und fügt zur Verhütung von Siedeverzug einige Siedesteinchen oder einige Stückchen granuliertes Zink hinzu. In die Vorlage (d) des Destillationsapparates (Fig. 11 oder 12)

Fig. 10.

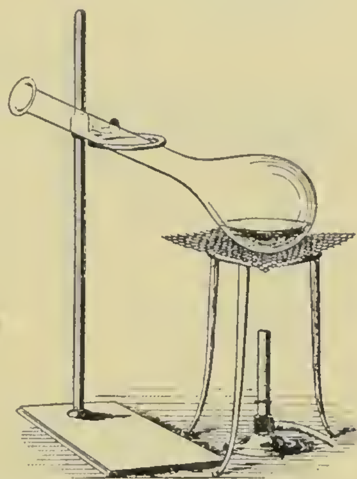
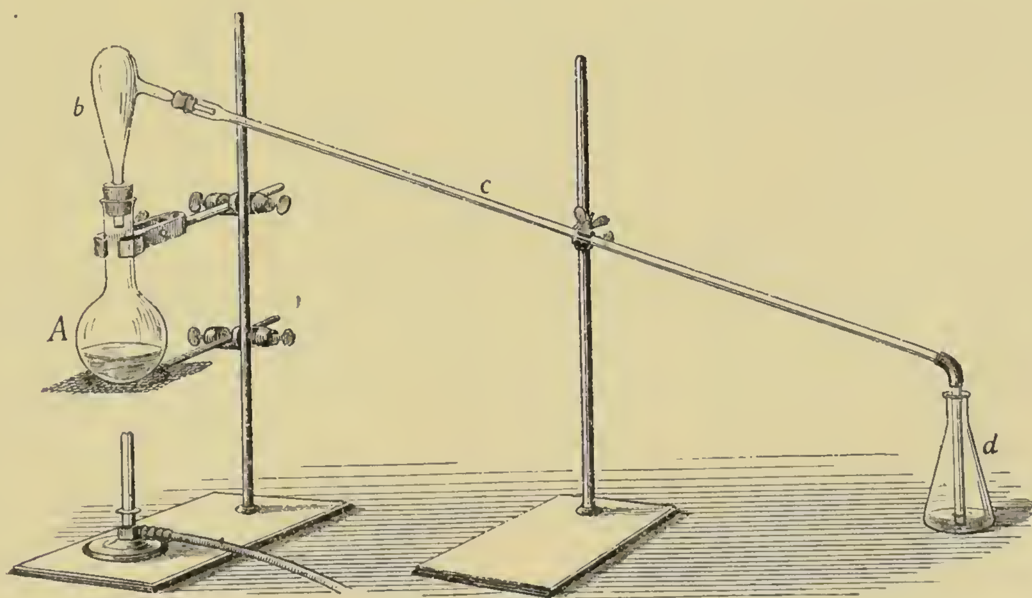


Fig. 11.



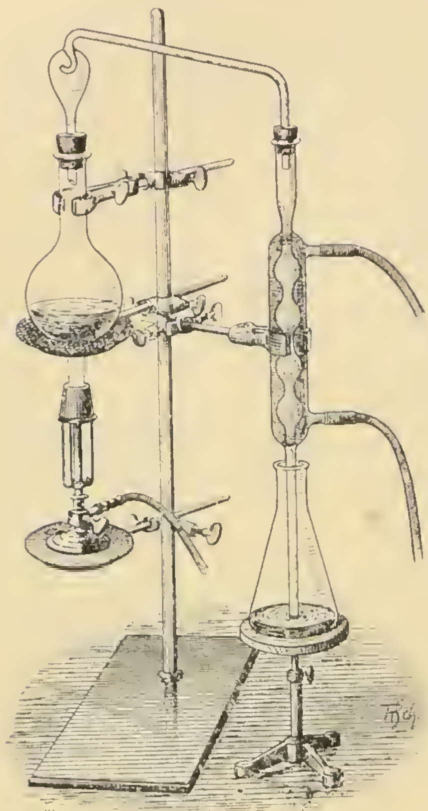
Apparat für die Ammoniakdestillation mit Luftkühlung.

hat man schon vorher aus einer Bürette genau 50 ccm $^1/_5$ n-Oxal-

[1]) Man sauge konzentrierte Schwefelsäure nicht in einer Pipette mit dem Munde auf!

säure oder $^1/_5$ n-Schwefelsäure gebracht [1]). Ferner mißt man in einem Meßzylinder 100 ccm einer ca. 25%igen Natronlauge [2]) ab, bringt zunächst mit Hilfe eines Trichters [3]) nur 30 ccm derselben zur Flüssigkeit im Destillationskolben, so daß diese noch sauer reagiert, dann kühlt man gut ab, gießt nun den Rest der Lauge auf einmal und rasch hinzu, verschließt den Destillationskolben sofort mit dem Gummistopfen, in dessen Oeffnung der Kugelaufsatz mit anschließendem Destillationsrohre sich befindet, und beginnt unverzüglich mit dem Erhitzen des Kolbens. Das Destillationsrohr muß mit seinem einen Ende ungefähr 1,5 bis 2 cm tief in die vorgelegte $^1/_5$ n-Säure eintauchen. Die Vorlage kann durch Einstellen in kaltes Wasser gekühlt werden, doch ist eine derartige Kühlung nicht unbedingt notwendig, da das übergehende Ammoniak von der in der Vorlage befindlichen Säure sofort gebunden wird; es entweicht keine Spur Ammoniak, auch wenn das Rohr nur 2 Centimeter tief in die Säure der Vorlage eintaucht.

Fig. 12.



Apparat für die Ammoniakdestillation mit Wasserkühlung.

Bei lebhaftem Kochen über einem Drahtnetze ist alles Ammoniak in 25 bis 30 Minuten übergetrieben. Ist die Destillation beendigt, so entfernt man zunächst den Stopfen mit Aufsatz vom Destillationskolben, oder man zieht das Destillationsrohr aus der vorgelegten Säure heraus in die Höhe und entfernt erst jetzt die Flamme unter dem Destillationskolben. Auf diese Weise vermeidet man, daß die Flüssigkeit der Vorlage in das Destillationsgefäß zurücksteigt. Man spült nun das Destillationsrohr, nicht aber den Aufsatz, einige Male mit wenig Wasser aus und zwar den Teil, der in die vorgelegte Säure eintauchte, auch von außen, kühlt das Destillat in der Vorlage auf Zimmertemperatur ab, fügt 3 bis 4 Tropfen (nicht mehr) Rosolsäurelösung hinzu und titriert den Ueberschuß der Säure mit $^1/_5$ n-Natron- oder Kalilauge zurück, d. h. man läßt die $^1/_5$ n-Lauge aus einer Bürette so lange vorsichtig zutropfen, bis eine gerade bleibende deutliche Rosafärbung eintritt. Bei einiger Uebung findet man die Endreaktion auf ein Tröpfchen $^1/_5$ n-Alkalilauge.

---

[1]) Bei konzentrierteren Harnen bringe man 60 ccm $^1/_5$ n-Schwefel- oder Oxalsäure in die Vorlage.

[2]) Oder 120 ccm einer ca. 25%igen Kalilauge.

[3]) Man vermeide, daß die Natronlauge mit dem oberen Teile des Kolbenhalses in Berührung kommt, weil sonst der Gummistopfen nicht festsitzt. Man gieße daher die Lauge mit Hilfe eines Trichters in den Kolben.

B e r e c h n u n g. Man zieht die beim Zurücktitrieren der überschüssigen Säure verbrauchte Anzahl ccm $^1/_5$ n-Alkalilauge von den vorgelegten 50 ccm $^1/_5$ n-Oxalsäure oder Schwefelsäure ab, um dadurch in ccm die Menge der $^1/_5$ n-Säure zu erfahren, welche von dem übergegangenen Ammoniak neutralisiert wurde; diese Menge $^1/_5$ n-Säure entspricht somit auch dem Gesamtstickstoffgehalt von 10 ccm Harn.

B e i s p i e l. Vorgelegt: 50 ccm $^1/_5$ n-Oxalsäure; zurückgemessen durch $^1/_5$ n-Alkalilauge: 23 ccm der $^1/_5$ n-Säure. 50—23 = 27 ccm $^1/_5$ n-Säure entsprechen somit den Gesamtstickstoff von 10 ccm Harn.

1000 ccm $^1/_1$ n-Säure neutralisieren NH_3 g u. entsprechen somit N g = 14,01 g N.

1000 ccm $^1/_5$ n-Säure » $\frac{NH_3}{5}$ g » » » $\frac{N}{5}$ g = $\frac{14{,}01}{5}$ = 2,802 g N.

1 ccm $^1/_5$ n-Säure zeigt demnach 0,002802 g N an.

27 ccm $^1/_5$ n-Säure = 27 × 0,002802 = 0,075654 g Stickstoff von 10 ccm Harn.

Die Tagesmenge Harn, zu 1500 ccm angenommen, hat dann 150 × 0,075654 = 11,4 g Stickstoff enthalten.

B e m e r k u n g e n. Es kommt häufig vor, daß sich beim Erhitzen des Harns mit der Schwefelsäure an der Wand des Kjeldahlkolbens oberhalb der kochenden Flüssigkeit k o h l i g e Teilchen festsetzen, die manchmal ungemein fest haften; diese Teilchen lassen sich durch vorsichtiges Umschwenken der heißen Flüssigkeit meist in diese zurückbringen. Gelingt dies nicht, so erhitzt man die Flüssigkeit zum stärksten Kochen, so daß konzentrierte Schwefelsäure reichlich an den Wänden des Kolbens herabfließt. Unter dem Einflusse der heißen Schwefelsäure werden die festsitzenden kohligen Massen losgelöst und fließen in die siedende Schwefelsäure zurück, wo sie dann meist rasch gelöst werden. — Selbstverständlich muß das Kochen des Harns mit der konz. Schwefelsäure u n t e r e i n e m g u t z i e h e n d e n A b z u g e vorgenommen werden.

K o n t r o l l v e r s u c h. Man unterlasse es nicht, den D e s t i l l a t i o n s r ü c k s t a n d auf einen etwaigen A m m o n i a k gehalt zu prüfen, indem man eine größere Menge desselben von dem ausgeschiedenen schwarzen Kupferoxyd abfiltriert und das klare Filtrat mit N e ß l e r ' s Reagens versetzt; dieses darf sich hierbei höchstens gelblich färben; auf jeden Fall darf kein gelbroter oder roter Niederschlag entstehen.

b) M i t Q u e c k s i l b e r a l s K a t a l y s a t o r.

Für sehr schwer oxydierbares, besonders fettreiches Material wie für Milch, Käse oder auch für Bier ist Quecksilber als Katalysator dem Kupfersulfat entschieden vorzuziehen. Für H a r n bietet die Quecksilbermethode vor der unter a) beschriebenen Methode kaum Vorzüge, denn die Kochdauer bis zum Klarwerden des Harn-Schwefelsäuregemisches ist in beiden Fällen die gleiche oder nahezu die gleiche, wie folgende Versuche gezeigt haben: K o c h d a u e r für

1. 10 ccm Harn + 10 ccm konz. Schwefelsäure + 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 5 g K_2SO_4: 18 Min.
2. 10 » » + 10 » » » + 0,8 g » + 5 g » 16 »
3. 10 » » + 10 » » » + 2 Tropfen Quecks. + 5 g K_2SO_4: 16 » [1]).

E r f o r d e r n i s s e. 1. Stickstoffreie konz. Schwefelsäure. 2. Metallisches

---

[1]) Selbstverständlich wurde für diese 3 Versuche der g l e i c h e H a r n verwendet; die Höhe der Bunsenflamme betrug bei allen drei Versuchen ca. 10 cm.

Quecksilber, zweckmäßig in einem Tropfgläschen. 3. Stickstofffreies reines Kaliumsulfat. 4. Natronlauge vom spez. Gew. 1,33, welche zur Ausfällung des Quecksilbers 2,5 Proz. Schwefelkalium enthält. 5. $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder $^1/_5$ n-Oxalsäure. 6. $^1/_5$ n-Alkalilauge. 7. Rosolsäurelösung oder gute Lackmustinktur.

Ausführung. Man bringt 10 ccm von dem mit einer Pipette oder in einer Bürette genau abgemessenen Harn in einen Kjeldahlkolben aus Jenaer Glas, fügt 10 ccm konz. Schwefelsäure, in einem Meßzylinder annähernd abgemessen, sowie 2 Tröpfchen Quecksilber hinzu und erhitzt nun den schräg gestellten Kjeldahlkolben etwa 10 Minuten lang unter einem gut ziehenden Abzuge; nun gibt man 5 g Kaliumsulfat dazu, kocht weiter, bis das Gemisch farblos geworden ist und unterhält das Kochen noch weitere 10 bis 15 Minuten. Das fast erkaltete Reaktionsgemisch verdünnt man vorsichtig mit Wasser und spült es ohne Verlust mit warmem Wasser in einen Destillationskolben von 800 bis 1000 ccm Inhalt. Im übrigen verfährt man in der unter a) angegebenen Weise, nur daß zum Uebersättigen der schwefelsauren Flüssigkeit im Destillationskolben statt der Kali- oder Natronlauge 100 ccm der schwefelkaliumhaltigen Natronlauge vom spez. Gew. 1,33 (4) verwendet wird. Zur Vermeidung des Stoßens beim Kochen der Flüssigkeit bringt man ein Stückchen Zink in den Destillationskolben, der selbstverständlich unverzüglich mit dem Destillationsrohr in Verbindung gesetzt werden muß, sobald die schwefelkaliumhaltige Natronlauge im Ueberschusse zugefügt ist. Schon vorher beschickt man die Vorlage des Destillationsapparates mit 50 oder 60 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder Oxalsäure.

Ammoniak.

Ammoniak ist ein normaler Bestandteil des Menschenharns; freilich findet es sich im frisch gelassenen, sauer reagierenden Harn des gesunden Menschen nicht in freiem Zustande, sondern in Form von Ammoniumsalzen vor. Bei gemischter Kost wird vom gesunden erwachsenen Menschen innerhalb 24 Stunden eine Menge von 0,6 bis 0,8 g, im Mittel 0,7 g NH_3, mit dem Harn ausgeschieden. Diese Ammoniakmenge macht 4,1 bis 5,6 Prozent von der Gesamtstickstoffmenge des Harns aus. — Da Trinkwasser und alle unsere Nahrungs- und Genußmittel höchstens Spuren von Ammoniumsalzen enthalten, muß das im Harn vorkommende Ammoniak in unserem Organismus selbst gebildet, vielmehr aus stickstoffhaltigen Komplexen abgespaltet werden. Wie unter dem Abschnitt »Harnstoff« eingehend behandelt ist, entsteht eine nicht unbedeutende Menge des mit dem Harne zur Ausscheidung kommenden Harnstoffs aus Ammoniak, kohlensaurem oder carbaminsaurem Ammonium durch einen synthetischen Prozeß. Das im Harne sich vorfindende Ammoniak dürfte ein Rest desjenigen Ammoniaks sein, welches zur Neutralisation von Säuren, welche bei der Verbrennung von organischem Material, besonders von Eiweißstoffen, entstehen, verbraucht wird und demnach zur Harnstoffsynthese keine Verwendung finden konnte. Diese Neutralisation durch Ammoniak im Organis-

mus des Menschen und der Fleischfresser tritt immer ein, wenn die bei der Verbrennung des organischen Materials gebildeten Säuren oder, richtiger gesagt, sauren Verbindungen sich den Basen gegenüber im Ueberschusse vorfinden. Mit dieser Anschauung stimmt auch die Beobachtung überein, daß die Ammoniakausscheidung bei vegetabilischer Kost kleiner ist als bei reichlicher Fleischkost, weil eben bei der letzteren die Säureproduktion größer ist als bei rein vegetabilischer Nahrung. Zufuhr von ätzenden und kohlensauren Akalien, sowie von gewissen Salzen organischer Säuren wie von zitronensaurem Kalium oder Natrium vermindert die Ammoniakausscheidung, während andrerseits durch Eingabe von anorganischen Säuren (Mineralsäuren) und von solchen organischen Säuren, welche im Organismus nicht zu Kohlensäure und Wasser verbrannt werden, die Ammoniakausscheidung vermehrt wird. Das bei der Eiweißaufspaltung frei gewordene Ammoniak wird also, zum Teil wenigstens, zur Neutralisation der eingeführten Säuren verwendet. Dies ist wenigstens der Fall beim Menschen und Hund, nicht aber in demselben Umfang beim Kaninchen und bei anderen typischen Pflanzenfressern. Infolge der Säureneutralisation durch das aus dem Eiweiß abgespaltene Ammoniak wird also beim Menschen wie auch beim Hunde verhindert, daß die für den Organismus notwendigen Alkalien dem Körper entzogen werden. Andrerseits wird durch diese Säureneutralisation einer zu großen Zunahme der Acidität des Harns vorgebeugt. — Wie die von außen zugeführten Säuren üben selbstverständlich auch die beim Eiweißzerfalle im Organismus selbst entstehenden Säuren einen Einfluß auf die Ammoniakausscheidung aus. Infolge dessen ist beim Menschen der Ammoniakgehalt des Harns unter solchen Umständen und bei solchen Krankheiten vermehrt, bei welchen durch gesteigerten Eiweißumsatz auch Säuren nämlich Schwefelsäure, Phosphorsäure, Oxalsäure, aromatische Oxysäuren, Hippursäure u. a., in größerer Menge entstehen. Dies ist beispielsweise der Fall bei akuten fieberhaften Krankheiten, bei welchen sich nach Hallervorden bis 5,93 g und mehr Ammoniak in der Tagesmenge Harn vorfinden kann. Beim Diabetes ist der Ammoniakgehalt des Harns häufig stark vermehrt, eine Vermehrung, die auf das Vorkommen von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure im Harne bei dieser Krankheit zurückzuführen ist. Diese Säuren gehen größtenteils als Ammoniumsalze in den Harn über. Bei einem Diabetiker betrug die in der Tagesmenge Harn sich vorfindende Ammoniakmenge 2 bis 3,5 g (Minkowski), in einem Falle sogar 4,6 g (Wright). Nach Eingabe von Natriumcarbonat will man beim Diabetiker wieder eine Verminderung der Ammoniakausscheidung beobachtet haben.

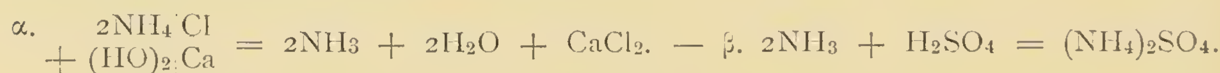
Kohlensaures Ammonium und Ammoniumsalze solcher organischer Säuren, welche im tierischen Organismus zu Kohlensäure und Wasser oxydiert werden, gehen unter normalen Verhältnissen in der

Leber in Harnstoff über. Das der Leber mit dem Blute[1]) zugeführte Ammoniak wird daselbst in Harnstoff umgewandelt. (Vergl. Harnstoff.) Es liegt daher die Annahme sehr nahe, daß bei Erkrankungen der Leber die Harnstoffbildung in diesem Organ eine Störung erleidet und daher vermindert, während andrerseits die Ammoniakausscheidung vermehrt ist. Diese Annahme trifft in der Tat für verschiedene Erkrankungen der Leber zu. So kamen nach Untersuchungen von Weintraud in zwei schweren Fällen von Lebercirrhose 7,5 bis 8,5 % des Gesamtstickstoffs auf das Ammoniak. Andrerseits darf aber nicht verschwiegen werden, daß auch bei gewissen Erkrankungen der Leber der Gehalt des Harns an Ammoniak sogar vermindert befunden wurde. Bemerkenswert ist ferner die Tatsache, daß auch bei Phosphorvergiftung die Ammoniakausscheidung stark vermehrt sein kann, was auf einen gestörten Leberstoffwechsel, vielleicht auf eine gesteigerte Säurebildung, bei derartigen Vergiftungen zurückzuführen ist.

Die Bestimmung des Ammoniaks im Harn.

1. Nach Schlösing.

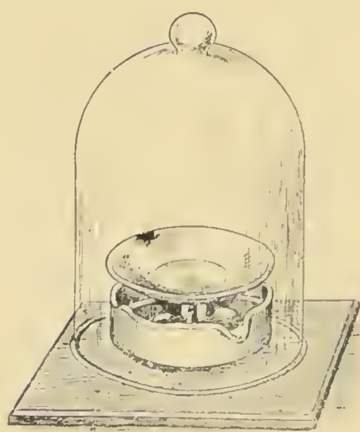
Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des mit Wasser angerührten Aetzkalks, also der Kalkmilch, nur aus den Ammoniumsalzen, nicht aber aus den anderen stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns Ammoniak frei zu machen (α), das man von einer abgemessenen Menge $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure absorbieren läßt (β):



α. $\begin{matrix} 2NH_4Cl \\ + (HO)_2Ca \end{matrix} = 2NH_3 + 2H_2O + CaCl_2$. — β. $2NH_3 + H_2SO_4 = (NH_4)_2SO_4$.

Schließlich wird der Ueberschuß der Säure mit $^1/_{10}$ n-Kali- oder Natronlauge zurückgemessen und das Ammoniak aus der Differenz berechnet.

Fig. 13.



Apparat für Bestimmung des Ammoniaks nach Schlösing.

Statt der Kalkmilch läßt sich auch eine 8—10 %ige Sodalösung verwenden. Kali- oder Natronlauge dürfen aber nicht verwandt werden, weil sie nicht nur aus den Ammoniumsalzen, sondern auch aus Harnstoff und anderen stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns Ammoniak in Freiheit setzen würden.

Ausführung. Man bringt 50 ccm des zu untersuchenden, zuvor filtrierten Harns in eine möglichst flache Schale, fügt etwa 20 ccm frisch bereiteter Kalkmilch, hinzu, stellt die Schale unter ein flaches Gefäß (Porzellanschale, Kristallisierschale), welches schon vorher mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure beschickt wurde, und bedeckt nun das Ganze sofort mit einer auf einer Glasplatte ruhenden, luftdicht schließenden,

[1]) Das Blut vom gesunden Menschen enthält im Liter ungefähr 0,9 mg Ammoniak.

also an ihrem Rande gut eingefetteten Glasglocke. Vgl. Fig. 13. Nach 3 bis 4 Tagen wird die Abnahme der Acidität der $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure mittels $^1/_{10}$ n-Natronlauge ermittelt. Zu dem Zweck versetzt man die ganze Menge der angewandten $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure mit 3 bis 4 Tropfen Rosolsäurelösung und läßt die $^1/_{10}$ n-Natronlauge aus einer Bürette bis gerade zur bleibenden schwachen Rosafärbung vorsichtig zutropfen.

Beispiel. Bei der Titration werden 29,4 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure zurückgemessen. 50—29,4 = 20,6 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure sind demnach durch das aus 50 ccm Harn frei gewordene Ammoniak neutralisiert. Da 1000 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure $\frac{NH_3}{10}$ = 1,7 g NH_3 neutralisieren, zeigt 1 ccm der $^1/_{10}$-Normalsäure 0,0017 g NH_3 an; 20,6 ccm $^1/_{10}$ n-Säure sättigen dann 20,6 $\times$ 0,0017 = 0,03502 g NH_3 ab. Diese Menge Ammoniak ist in 50 ccm Harn enthalten, und es sind somit in der Tagesmenge des untersuchten Harns (1500 ccm) 30 $\times$ 0,03502 = 1,0500 g NH_3 vorhanden gewesen.

2. Die von Philipp Shaffer modifizierte Schlösing'sche Methode[1]).

Die Schlösing'sche Methode der Ammoniakbestimmung gibt nach Shaffer nur dann brauchbare Werte, wenn die Flüssigkeiten in den Schalen, also Harn + Kalkmilch, sowie die $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure, nicht höher als 2 mm stehen. — Nach Shaffer arbeitet man in der folgenden Weise:

Man gibt 25 ccm des filtrierten Harns in eine Schale von 15 bis 17 cm Durchmesser, fügt 1 g Soda sowie reichlich Chlornatrium hinzu und läßt das Gemisch 3 bis 4 Tage bei ca. 20° unter einer absolut dicht schließenden Glasglocke stehen, unter welcher man das frei gewordene Ammoniak von 50 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure absorbieren läßt. — Je flacher die Flüssigkeitsschicht ist, desto schneller erfolgt die Abgabe des Ammoniaks. Auch bei dieser Methode sind Abweichungen bis etwa 40 mg NH_3 im Liter Harn möglich.

Bemerkungen. Eiweißhaltige Harne müssen für die Bestimmungen des Ammoniaks nach Schlösing erst von Eiweiß befreit werden; es geschieht dies nach Krüger und Reich am besten durch Schütteln von 100 ccm Harn mit 1 g gepulverter Zitronensäure und 0,5 g Pikrinsäure und darauf folgendes Abfiltrieren; das Filtrat dient dann zur Bestimmung des Ammoniaks.

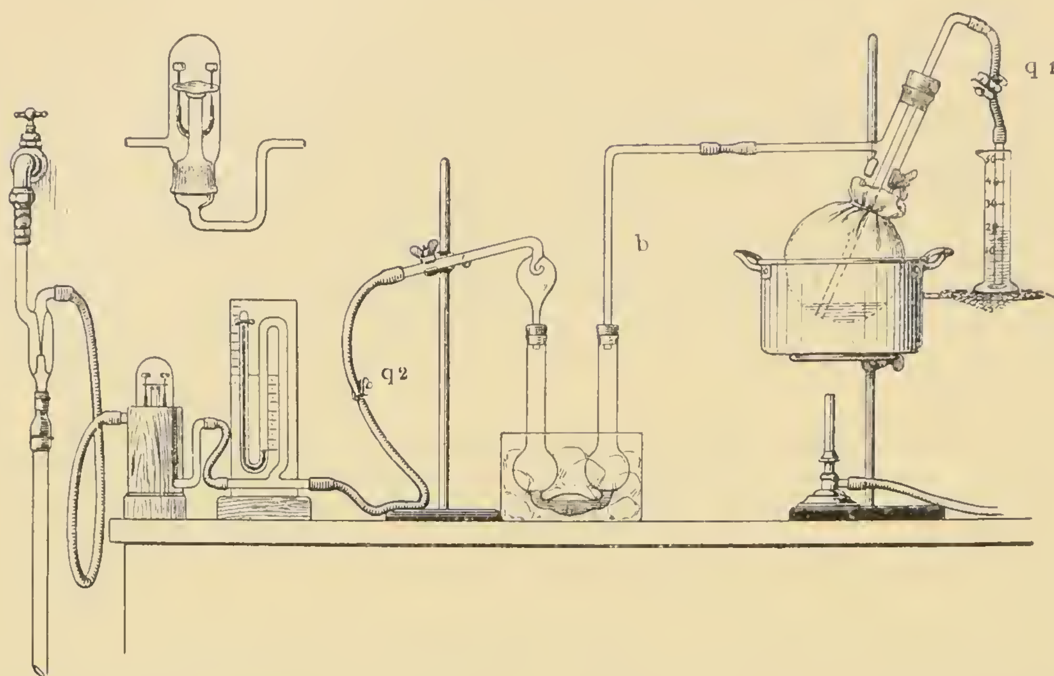
3. Die Bestimmungen des Ammoniaks nach M. Krüger-O. Reich und nach A. Schittenhelm.

Nach diesen beiden Methoden destilliert man das Ammoniak, welches aus dem mit Kalkmilch oder mit kristallisierter Soda alkalisch gemachten Harne frei wird, im luftverdünnten Raume bei nicht zu hoher Temperatur ab und läßt es von einer überschüssigen abgemessenen Menge $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure absorbieren. Da Harne bei der Destillation, zumal bei der Vacuumdestillation, stark schäumen und da-

[1]) Americ. Journ. of Physiology 8, 330 (1903).

her leicht in die Vorlage übersteigen können, versetzt man das Harngemisch mit Alkohol, um das Schäumen möglichst zu verhindern. Die Destillation führt man in dem nebenan abgebildeten Apparate aus (Fig. 14).

Fig. 14.



Apparat für die Bestimmung des Ammoniaks nach Krüger-Reich-Schittenhelm.

A. Nach M. Krüger-O. Reich[1]). In die als Vorlage dienende Péligotröhre, die während der Destillation mit Eis gut zu kühlen ist, bringt man 25 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure und in den Destillationskolben 25 ccm des filtrierten Harns, 10 ccm frisch bereitete, wirksame Kalkmilch sowie 15 ccm 90%igen Alkohol. Man verschließt jetzt den Kolben sofort, indem man die längere Röhre a sich bis auf wenige Millimeter dem Boden nähern läßt; nun werden die Quetschhähne q1 und q2 geschlossen und die Wasserstrahlpumpe in Gang gesetzt. Darnach werden durch recht vorsichtiges Oeffnen des Quetschhahnes q2 Kolben und Vorlage allmählich evakuiert; gleichzeitig beginnt man mit dem Anheizen des Wasserbades und läßt die Temperatur des letzteren nicht über 43° steigen. Vom Beginn des lebhaften Siedens an gerechnet, wird die Destillation 17 Minuten unter einem Drucke von 30—40 mm Quecksilber fortgesetzt. Die Wassertropfen, welche sich nach Verjagung des Alkohols am Kolbenhalse festsetzen und die Ammoniak enthalten können, werden durch Umwickeln des Kolbenhalses mit einem warmen Tuche entfernt. Zum Schlusse läßt man durch die Röhre a unter Oeffnen des Quetschhahnes q1 10 ccm Alkohol zufließen, welcher den Kolbeninhalt wieder in lebhaftes Sieden bringt und die in der Ueberleitungsröhre b befindlichen Wassertropfen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 165 (1903).

hinwegspült. Nach Beendigung der Destillation schließt man zunächst den Quetschhahn q 2, sperrt die Wasserleitung ab und läßt durch die Röhre a Luft in den Kolben und die Vorlage eintreten. Darnach spült man den Inhalt der Péligotröhre ohne Verlust in ein Becherglas und titriert schließlich die überschüssige $^1/_{10}$ n-Säure, unter Verwendung von 4 bis höchstens 5 Tropfen Rosolsäurelösung als Indikator, mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge zurück. Der Farbenwechsel der Rosolsäure beim Uebergang von saurer zur neutralen Reaktion ist offenbar infolge der Anwesenheit von Alkohol sehr scharf.

B. Nach A. Schittenhelm[1]). Die Destillation wird ebenfalls in dem von Krüger und Reich empfohlenen Apparate (Fig. 14) vorgenommen. 25 bis 30 ccm des filtrierten Harns werden im Destillationskolben erst mit 10 g Natriumchlorid, dann mit soviel kristallisiertem Natriumcarbonat zusammengebracht, daß das Gemisch deutlich alkalisch reagiert. Hierzu genügt meist 1 g Natriumcarbonat. Hierauf wird der Kolben ins Wasserbad gesetzt und mit der als Vorlage dienenden, in Eis ruhenden Péligotröhre, welche schon vorher mit 25 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure, sowie mit 3 bis 4 Tropfen Rosolsäurelösung beschickt wurde, in Verbindung gebracht. An dem zweiten Schenkel der Péligotröhre wird die Wasserstrahlpumpe angeschlossen und mittels dieser sofort so gut wie möglich evakuiert. Sobald das Vacuum den höchsten Grad erreicht hat, öffnet man den Quetschhahn q1, läßt 20 ccm Alkohol zufließen und bringt nun das Wasserbad auf eine Temperatur von ca. 43°. Schittenhelm läßt durch vorsichtiges Oeffnen des Quetschhahnes q1 von 10 zu 10 Minuten je 15 bis 20 ccm Alkohol zufließen, eventuell auch noch 10 bis 15 ccm Wasser, falls die Flüssigkeit zu stark eindampfen sollte. Zum Schlusse werden zur Verjagung der Wassertropfen in der Ueberleitungsröhre, welche möglicherweise Ammoniak enthalten, nochmals 10 ccm Alkohol in der angegebenen Weise zugegeben. Nach 30 bis 40 Minuten ist die Destillation beendigt. Man schließt nun den Quetschhahn q 2 und läßt andrerseits durch vorsichtiges Oeffnen des Quetschhahnes q 1 die Luft langsam in den Kolben und die Vorlage einströmen. Schließlich wird der Inhalt der Péligotröhre in ein Becherglas gebracht und die überschüssige $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure in der unter A) angegebenen Weise zurückgemessen.

Bestimmungen und Belege.

I. Nach Krüger-Reich. 30 ccm Harn + 10 ccm Kalkmilch + 20 ccm Alkohol. Dauer der Destillation: 25 Minuten bei 43°. Vom Ammoniak verbraucht: α) 7,0 ccm, β) 6,9 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure. Die Tagesmenge Harn (1500 ccm) enthält somit nach α) 0,595 g NH_3, nach β) 0,586 g NH_3.

II. Nach Schittenhelm, 30 ccm Harn + 10 g NaCl + 1 g Na_2CO_3 + 20 ccm Alkohol. Dauer der Destillation: 30 Minuten bei 43°. Vom Ammoniak verbraucht: 6,9 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure = 0,586 g NH_3 in 1500 ccm Harn.

Bemerkungen. Die Krüger-Reich'sche Methode ist für die Be-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 73 (1903).

stimmung des Ammoniaks im Harn durchaus vollkommen und zweckmäßig; es ist zudem eine Methode, die sich infolge ihrer Einfachheit und leichten Ausführung auch für klinische Zwecke vorzüglich eignet. — Die Anwendung derselben für die Bestimmung des Ammoniaks der Faeces stößt dagegen insofern auf Schwierigkeiten, als dabei eine gleichmäßig verlaufende Zersetzung stickstoffhaltiger organischer Substanzen stattfindet (A. Schittenhelm)[1]. Nicht die Temperatur, sondern die angewandte Kalkmilch trägt die Schuld an der Zersetzung der stickstoffhaltigen Substanzen der Faeces. Schittenhelm kam zu denselben Resultaten wie O. Folin, daß nämlich an der Zersetzung dieser stickstoffhaltigen Substanzen die Hydroxyl-Jonen liefernden Agentien Schuld sind. Folin verwendet daher Natriumchlorid plus Natriumkarbonat zur Alkalisierung und Zersetzung der Ammoniumsalze der Faeces. Durch den Zusatz des Chlornatriums wird der Dissoziationsgrad des Natriumkarbonats zurückgedrängt. Bei Verwendung von Natriumkarbonat als Alkalisierungsmittel hat sich die Vacuumdestillation für die verschiedenartigsten Objekte wie für Blut, Faeces, Harn als durchaus zuverlässig erwiesen. — Im Hinblick auf die leichte Zersetzlichkeit des Harnstoffs durch Bakterien — ammoniakalische Gährung des Harns — darf für die Ammoniakbestimmung nur frischer oder gut konservierter Harn in Untersuchung genommen werden. Die Konservierung des Harns geschieht am besten mit Chloroform, von dem man soviel zusetzt, daß beim tüchtigen Umschütteln des Harns einige ccm ungelöst bleiben.

4. Die Bestimmung des Ammoniak nach O. Folin[2]).

Nach dieser Methode wird das durch Natriumcarbonat bei Gegenwart von viel Natriumchlorid aus den Ammoniumsalzen des Harns freigemachte Ammoniak bei Zimmertemperatur durch einen starken Luftstrom ausgetrieben, in einem Ueberschusse von $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure aufgefangen und schließlich nach Bestimmung der überschüssigen Säure durch Titration mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge auf rechnerischem Wege bestimmt.

Ausführung. 25 ccm des filtrierten Harns werden in einem Glaszylinder von 45 cm Höhe und 5 cm Durchmesser mit 10 g Natriumchlorid, 5—10 ccm Toluol — zur Verhütung des Schäumens — und zuletzt mit 1 g wasserfreiem Natriumcarbonat versetzt. Mit Hilfe einer gut wirkenden Wasserstrahlluftpumpe wird nun ein starker Luftstrom durch das Gemisch hindurchgeleitet, und zwar so lange, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist, was in $1^1/_2$—2 Stunden erreicht ist, wenn man in der Stunde 600—700 Liter Luft hindurchschickt. Die aus dem Harne austretende, das Ammoniak enthaltende Luft wird zunächst durch einen Baumwollpfropfen geleitet, der mechanisch mitgerissenes Alkali zurückhalten soll, alsdann durch zwei, eine abgemessene Menge $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure (je 25 ccm), sowie Wasser enthaltende Vorlagen geführt. Schließlich wird wie bei allen Methoden der Ammoniakbestimmung der Ueberschuß der $^1/_{10}$ n-Säure unter Anwendung von Rosolsäurelösung (3—4 Tropfen) als Indikator mit $^1/_{10}$ n-Alkalilauge zurückgemessen.

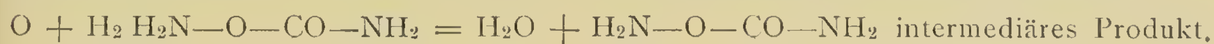
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 73 (1903).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 161 (1902/1903).

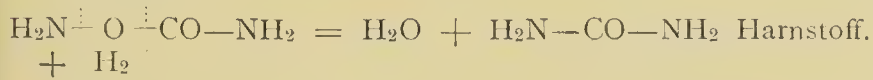
Statt der 25 ccm können auch 50 oder 100 ccm Harn für die Ammoniakbestimmung benutzt werden. Nur muß dann der Luftstrom $2^1/_2$ bis 3 Stunden bei 20—25° hindurchgeleitet werden, um das Ammoniak des Harns vollständig auszutreiben.

Bemerkungen. Harn schäumt sehr stark beim Durchleiten von Luft, gerade so wie beim Kochen; um das Schäumen möglichst vollständig zurückzudrängen, setzt man dem zu untersuchenden Harn 5 bis 10 ccm Petroleum oder Toluol zu. Bei der Untersuchung von Blut oder anderen stark eiweißhaltigen Flüssigkeiten muß neben Toluol etwas Methylalkohol zugesetzt werden. Hierdurch wird zwar das Schäumen vollständig beseitigt, nur muß der Zusatz von Methylalkohol nach einiger Zeit erneuert werden. — O. Folin empfiehlt als Indikator Alizarinrot in 1%iger Lösung, von welcher für 200 bis 300 ccm Flüssigkeit nur zwei Tropfen zu verwenden sind. Man soll hierbei nur bis zur Rot- und nicht bis zur Violettfärbung titrieren. Alizarinrot hat vor manchen anderen empfindlicheren Indikatoren den Vorzug, daß mäßige Mengen Kohlensäure, Ammoniumsalze, Methylalkohol oder Toluol die Titration durchaus nicht stören. — Nach den von O. Folin angegebenen Analysenbelegen gibt seine Methode der Ammoniakbestimmung im Harn durchaus zufriedenstellende Werte.

Carbaminsäure.

Carbaminsäure $H_2N \cdot CO \cdot OH$ soll nach Ansicht verschiedener Forscher in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten vorkommen. Drechsel[1]) hat die Entstehung von carbaminsaurem Ammonium durch Oxydation von Aminosäuren in alkalischer Lösung festgestellt, ferner das Vorhandensein desselben Salzes im Blutserum des Hundes und im alkalisch reagierenden Harn des Pferdes nachgewiesen. Durch elektrische Wechselströme ist es endlich Drechsel gelungen, aus carbaminsaurem Ammonium Harnstoff darzustellen. Aus diesen Tatsachen hat Drechsel geschlossen, daß das Ammoniumsalz der Carbaminsäure eine Zwischenstufe ist bei der physiologischen Harnstoffbildung im Säugetierorganismus. Das durch Oxydation des Eiweißes und seiner Abkömmlinge, der Aminosäuren, gebildete carbaminsaure Ammonium soll durch abwechselnde Oxydation und Reduktion in Harnstoff übergehen. Für diese Harnstoffsynthese hat Drechsel die folgenden Formeln aufgestellt:



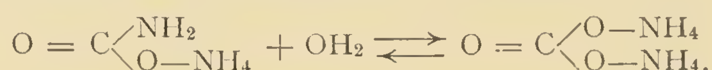


Nach Eingabe von Kalkmilch fanden Abel und Muirhead die Menge der Carbaminsäure im Menschen- und Pferdeharn stark vermehrt. Nach Hahn und Nencki kommt die Säure bei hochgradiger Störung der Lebertätigkeit in vermehrter Menge im Harne vor. Nun hat P. Nolf[2]) durch eine ganze Reihe von Versuchen nachgewiesen, daß sich in einer wässerigen Lösung von neutralem Ammoniumcarbonat oder in einem Gemisch von Ammoniumchlorid und Natriumcarbonat erhebliche

[1]) Journal f. praktische Chemie (N. F.) Bd. **12**, 417 (1875), **16**, 180 (1877).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **23**, 503 (1897).

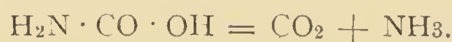
Mengen von Carbaminsäure vorfinden. Dasselbe gilt für Ammoniumbicarbonat oder ein Gemisch von reinem Natriumbicarbonat und Ammoniumchlorid. Eine wässerige Lösung von freier Kohlensäure und Chlorammonium gibt ganz ähnliche Resultate. An Stelle von Chlorammonium kann jedes andere Ammoniumsalz verwandt werden. Zwischen dem kohlensauren und dem carbaminsauren Ammonium dürfte in wässeriger Lösung ein Gleichgewichtszustand bestehen und zwar in dem Sinne, daß durch Zusatz von viel Ammoniak und wahrscheinlich auch durch Temperaturerniedrigung die Menge des carbaminsauren Salzes auf Kosten des kohlensauren vergrößert wird, daß aber der entgegengesetzte Vorgang sich abspielt, wenn die Temperatur erhöht und Kohlensäure zugeführt wird. Entsprechend dieses Gleichgewichtszustandes geht reines carbaminsaures Ammonium in wässeriger Lösung zu einem bestimmten Teile alsbald in kohlensaures Ammonium über:



$$O = C\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown O-NH_4\end{matrix} + OH_2 \rightleftarrows O = C\begin{matrix}\diagup O-NH_4 \\ \diagdown O-NH_4.\end{matrix}$$

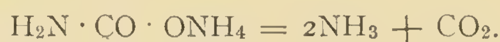
Durch die Untersuchungsergebnisse von P. Nolf ist somit die physiologische Herkunft der Carbaminsäure sehr in Frage gestellt.

Die freie Carbaminsäure ist nicht existenzfähig, denn, aus ihren Salzen frei gemacht, zerfällt sie sofort in Kohlensäureanhydrid und Ammoniak:



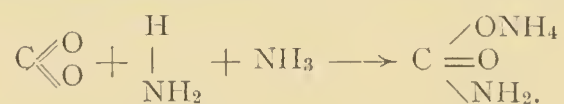
$$H_2N \cdot CO \cdot OH = CO_2 + NH_3.$$

Auch die Salze der Carbaminsäure, Carbamate genannt, die alle in Wasser löslich sind und die aus ihrer wässerigen Lösung durch Alkohol ausgefällt werden, zersetzen sich in wässeriger Lösung, besonders beim Erwärmen; das carbaminsaure Ammonium zerfällt hierbei in Ammoniak und Kohlensäure:



$$H_2N \cdot CO \cdot ONH_4 = 2NH_3 + CO_2.$$

Aus starker Ammoniakflüssigkeit lassen sich aber verschiedene Carbamate fast ohne Zersetzung umkristallisieren. Carbaminsaures Ammonium erhält man in trockenem Zustande durch Vereinigung von trockenem Kohlensäureanhydrid (1 Vol.) und Ammoniak (2 Vol.):



$$C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O \\ \diagdown\!\!\diagdown O\end{matrix} + \begin{matrix}H \\ | \\ NH_2\end{matrix} + NH_3 \longrightarrow C\begin{matrix}\diagup ONH_4 \\ = O \\ \diagdown NH_2.\end{matrix}$$

In Lösung erhält man es beim Einleiten von Kohlensäureanhydrid in starkes Ammoniak. Eine frisch hergestellte wässerige Lösung von Ammoniumcarbamat bleibt mit Calciumchlorid zunächst klar, trübt sich aber alsbald nach kurzer Zeit unter Abscheidung von Calciumcarbonat. — Carbaminsaures Calcium $(NH_2 \cdot OC \cdot O)_2Ca + {}^1/_2 H_2O$ wird aus seiner gesättigten Lösung in 30—40° warmem gesättigtem Ammoniak in vierseitigen Prismen erhalten; aus einer wässerigen Lösung wird es durch Alkohol zunächst amorph gefällt, wird aber dann kristallinisch. Das reine carbaminsaure Calcium löst sich in Wasser ziemlich leicht und gibt zunächst eine klare Lösung, aber schon nach kurzer Zeit

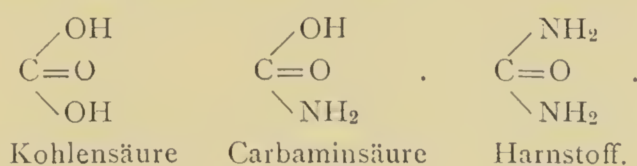
scheidet sich unter Freiwerden von Ammoniak und von Kohlensäure Calciumcarbonat ab.

Nachweis der Carbaminsäure des Harns nach Abel und Drechsel.

Man versetzt eine größere Menge Harn mit viel frisch bereiteter, dicker Kalkmilch, schüttelt 10 Minuten lang tüchtig durch und filtriert ab. Das klare Filtrat, welches mit Kalkwasser keinen Niederschlag mehr geben darf, wird mit Chlorcalcium versetzt, um etwa noch in Lösung befindliches Carbonat in Calciumcarbonat überzuführen und mit etwas kristallinischem Calciumcarbonat in einem verschlossenen Gefäß 15 Minuten lang kräftig geschüttelt. Hierdurch wird der noch in Lösung oder Suspension befindliche kohlensaure Kalk gleichfalls kristallinisch und vollständig zur Abscheidung gebracht; der Niederschlag setzt sich im Eisschrank alsbald ab; man filtriert nun in das dreifache Volumen Alkohol, der mit Eis gut abgekühlt ist, und läßt die Mischung zum Absitzenlassen des Niederschlags $^1/_2$ Tag im Eisschranke stehen. Die Flüssigkeit wird abgehebert, der Niederschlag, zweckmäßig nach dem Zentrifugieren, gut abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Zur weiteren Reinigung löst man den Niederschlag in 10%igem wässerigem Ammoniak, filtriert, versetzt das Filtrat mit absolutem Alkohol bis zur bleibenden Trübung, läßt im Eisschranke absetzen, bewirkt dann durch weiteren Alkoholzusatz einen ebensolchen geringen Niederschlag und fällt nun das Filtrat mit Alkohol vollständig aus. Nach dem Absitzenlassen im Eisschrank wird dann der gebildete Niederschlag abgesaugt und wie das erste Mal weiterbehandelt. — Man erhält auf diese Weise eine hellbraune Substanz, die nicht nach Ammoniak riecht und sich in viel Wasser vollständig und klar löst. Diese wässerige Lösung trübt sich aber nach kurzer Zeit, beim Erwärmen sofort, und zwar unter Abscheidung von kohlensaurem Calcium und unter Freiwerden von Ammoniak. Die wässerige Lösung verhält sich somit wie eine solche von carbaminsaurem Calcium. Aber auch das nach dem angegebenen Verfahren gereinigte Salz besteht keineswegs nur aus carbaminsaurem Calcium, sondern enthält noch Calciumsulfat und meist eine größere Menge von ätherschwefelsaurem Salz beigemengt.

Harnstoff.

Von der hypothetischen Kohlensäure als einer zweibasischen Säure leitet sich eine Aminosäure, die Carbaminsäure, und ein Diamid, das Carbamid oder der Harnstoff ab:



Kohlensäure Carbaminsäure Harnstoff.

Harnstoff findet sich im Harne des Pflanzenfressers nur in geringer Menge, während er im Harn des Fleischfressers und des Menschen

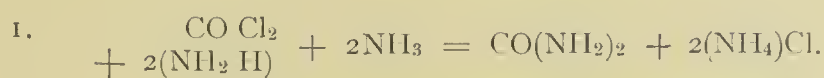
die Hauptmenge der stickstoffhaltigen Bestandteile dieser Harne ausmacht. Bei einem typischen Fleischfresser wie beim Hund kann der Harnstoffstickstoff bei eiweißreichem Futter selbst 98 % des Gesamtstickstoffs des Harns ausmachen. Im Menschenharn können bei reichlicher Eiweißernährung 87—88 % des Gesamtstickstoffs auf den Harnstoffstickstoff kommen, bei eiweißarmer Nahrung kann aber der letztere auf 60 % zurückgehen. Das Gleiche kann bei gewissen Krankheiten der Fall sein. Die Menge Harnstoff, welche bei normaler Ernährungsweise, also bei gemischter Kost, vom erwachsenen gesunden Menschen innerhalb 24 Stunden mit dem Harne abgesondert wird, beträgt etwa 30—35 g, eine Menge, die etwa 2 % Harnstoff entspricht. — Harnstoff findet sich ferner, wenn auch nur in sehr kleiner Menge, im Blut, Schweiße und in mehreren Organen, wie in Leber, Milz und Muskeln. Bei gehinderter Ausscheidung durch die Niere kann der Harnstoff in größerer Menge in den tierischen Säften und Geweben auftreten.

In quantitativer Hinsicht ist der Harnstoff das wichtigste stickstoffhaltige Endprodukt der Umsetzung der Eiweißstoffe im Organismus des Menschen und vieler Tiere, besonders der Fleischfresser. Die Harnstoffausscheidung durch die Niere muß daher abhängig sein von der Größe des Eiweißumsatzes, und zwar in erster Linie von der Menge des mit der Nahrung aufgenommenen und zur Resorption gelangten Eiweißes. Die Harnstoffausscheidung ist somit am größten bei sehr eiweißreicher Kost, wie dies bei einseitiger Fleischnahrung der Fall ist, und ist am geringsten, sogar kleiner als im Hungerzustande, bei einseitiger Ernährung mit stickstofffreiem organischem Nährmaterial, nämlich mit Fett und Kohlehydraten; die letzteren setzen nämlich den Umsatz des Körpereiweißes bedeutend herab. — Wenn Körpereiweiß in größerer Menge verbraucht wird, wie dies bei verschiedenen Krankheiten und bei gewissen Vergiftungen der Fall ist, so ist selbstverständlich die Stickstoffausscheidung mehr oder weniger vermehrt. In vielen derartigen Fällen, aber nicht immer, ist dann auch die Harnstoffausscheidung gesteigert. Andrerseits kann der Gehalt des Harns an Harnstoff bei Krankheiten auch bedeutend zurückgehen, und es kann sich auf Kosten des Harnstoffs der Gehalt des Harns an anderen stickstoffhaltigen Harnbestandteilen stark vermehren. Bei gewissen Erkrankungen der Leber kann man häufig eine Verminderung des Harnstoffs und eine Vermehrung der Ammoniumsalze des Harns nachweisen, eine Tatsache, die für die Annahme einer Harnstoffbildung in der Leber von Bedeutung ist.

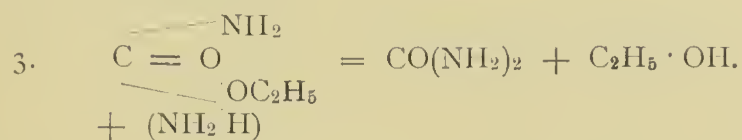
Nach dem Gesagten muß es als selbstverständlich erscheinen, daß bei eiweißarmer Kost, im Hungerzustande sowie bei herabgesetztem Verbrauche an Körpereiweiß die Stickstoffausscheidung und demnach auch die Harnstoffmenge im Harne vermindert sind.

Bildung und Darstellung. Harnstoff als ein Säureamid kann nach den allgemeinen Bildungsweisen der Säureamide erhalten werden, nämlich aus dem Carbonylchlorid oder Phosgen (1), aus

den Kohlensäureestern (2) und Carbaminsäureestern oder den Urethanen (3), mit Ammoniak, sowie beim Erhitzen von carbaminsaurem Ammonium im geschlossenen Rohr auf 130—140° (4):

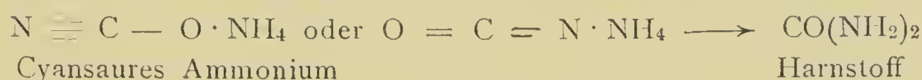








4. Wöhlers Harnstoffsynthese (1828). Cyansaures Ammonium[1]) geht beim Verdunsten seiner wässerigen Lösung durch intramolekulare Umlagerung in den isomeren Harnstoff über:

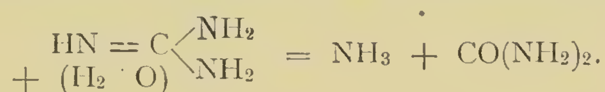


5. Aus Cyanamid durch Hydrolyse. Beim Behandeln mit 50%iger Schwefelsäure geht Cyanamid leicht in Harnstoff über (E. Baumann[2]):

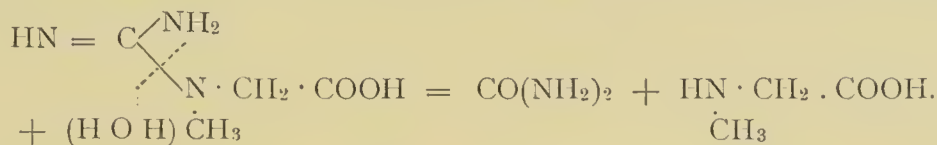


Beim Versetzen einer ätherischen Lösung von Cyanamid mit Salpetersäure fällt direkt salpetersaurer Harnstoff aus.

6. Aus Guanidin durch Hydrolyse. Guanidin zerfällt beim Kochen mit Barytwasser in Harnstoff und Ammoniak (E. Baumann l. c.).



7. Aus Kreatin durch Hydrolyse. Kreatin zerfällt beim Kochen mit Barytwasser in Harnstoff und Sarkosin = Methylglykokoll:



8. Aus Arginin durch Hydrolyse. Arginin zerfällt bei der

---

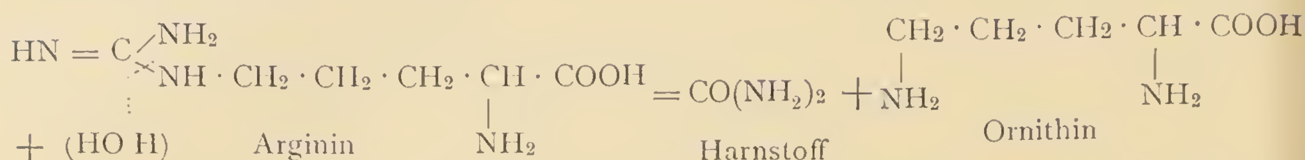
[1]) Für die Cyansäure, die nur in einer Form bekannt ist, lassen sich mit gleichem Rechte die beiden folgenden Konstitutionsformeln aufstellen:



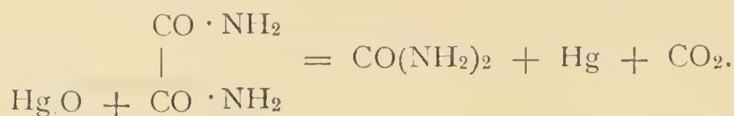
Auch die cyansauren Salze, Cyanate genannt, existieren jeweils nur in einer Form. Es liegt in der Cyansäure ein Fall von Tautomerie vor.

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 6, 1373 (1873).

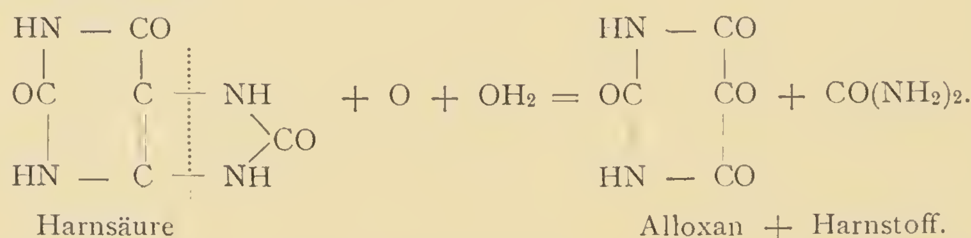
Einwirkung des Enzyms Arginase[1]) sowie beim Kochen mit Barytwasser in Harnstoff und Ornithin:



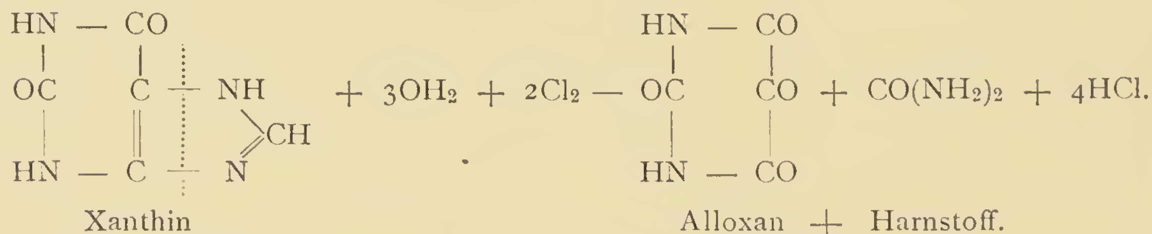
9. Aus Oxamid durch Oxydation. Beim Erhitzen von Oxamid mit Quecksilberoxyd entsteht Harnstoff neben Kohlendioxyd:



10. Physiologisch bemerkenswert ist die Bildung von Harnstoff aus Purinderivaten und Pyrimidinen, nämlich durch Oxydation derselben mit Kaliumpermanganat oder anderen Oxydationsmitteln; z. B. wird Harnsäure durch Salpetersäure zu Alloxan und Harnstoff oxydiert:



Dieselben Endprodukte entstehen beim Behandeln von Xanthin mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium oder Chlorwasser (Emil Fischer[2]):



Physiologisch interessant ist auch die Bildung von Harnstoff aus Eiweißstoffen, Aminosäuren sowie aus zahlreichen stickstofffreien Substanzen, wie aus Oxysäuren der Fettreihe, wenn diese Stoffe bei 40° und in Gegenwart von Ammoniak durch Kaliumpermanganat oxydiert werden.

Darstellung des Harnstoffs.

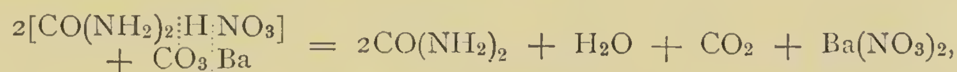
1. Aus Menschenharn. 1½—2 Liter eines Harns, der noch nicht in die alkalische Gährung übergegangen ist, werden in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Sirupkonsistenz eingedampft;

[1]) Nach A. Kossel und H. D. Dakin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 321 (1904) und ebenda **42**, 181 (1904), ist das Enzym Arginase im tierischen Organismus weit verbreitet und zwar kommt der Leber die kräftigste Arganisewirkung zu; schwächer, aber immer noch sehr deutlich ist diese Wirkung in der Niere, der Thymusdrüse und in den Lymphdrüsen, etwas geringer in der Darmschleimhaut.

[2]) Ann. der Chemie **215**, 310 (1882).

der Rückstand wird mit ca. 200 ccm Alkohol gut durchrührt, dann abfiltriert, aus dem Filtrate der Alkohol auf dem Wasserbade vollständig verdampft und der hierbei bleibende Rückstand nach dem Erkalten mit etwa dem gleichen Volumen einer abgekühlten Mischung aus gleichen Raumteilen konzentrierter Salpetersäure und Wasser unter guter Kühlung und unter Umrühren allmählich versetzt. Es scheidet sich hierbei meist sofort, manchmal erst beim Stehenlassen, ein kristallinischer rötlich oder bräunlich gefärbter Niederschlag von salpetersaurem Harnstoff $CO(NH_2)_2 \cdot HNO_3$ aus. Nach etwa $^1/_2$ Stunde wird der Niederschlag auf einer Nutsche gesammelt, gut abgesaugt, dann in einer geräumigen Porzellanschale mit wenig Wasser zu einem dünnen Brei angerührt und Baryumcarbonat, das ebenfalls mit Wasser aufgeschlämmt ist, so lange eingetragen, als noch ein Aufbrausen von entweichender Kohlensäure erfolgt. Das so erhaltene Gemisch wird auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 50—60 ccm absolutem Alkohol durchrührt, dann durch ein trockenes Filter gegossen, und das Filtrat auf dem Wasserbade eingedunstet. Der Rückstand erstarrt, besonders beim Stehenlassen auf Eis, kristallinisch; man läßt nach einiger Zeit die Mutterlauge von den ausgeschiedenen, meist stark gefärbten Harnstoffkristallen abtropfen, löst die letzteren in wenig heißem Wasser, schüttelt die Lösung mit etwa $^1/_2$ g wirksamer Blutkohle tüchtig durch, filtriert noch heiß ab, dunstet das nun farblose oder nahezu farblose Filtrat auf dem Wasserbade auf einige Kubikzentimeter ein und stellt es zur Kristallisation an einen kühlen Ort, zweckmäßig in den Eisschrank. — Man kann die wässerige, durch Blutkohle entfärbte Harnstofflösung auch im Vacuum über Schwefelsäure auskristallisieren lassen. Die Ausbeute an reinem Harnstoff beträgt meist nur einige Gramm, selbst wenn 2 Liter frischer Harn oder mehr verarbeitet werden.

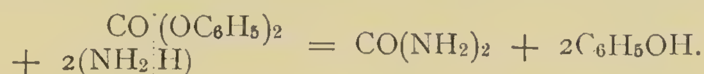
Bemerkung. Baryumcarbonat macht aus dem salpetersauren Harnstoff den Harnstoff als solchen frei:



$$\begin{matrix} 2[CO(NH_2)_2 \cdot H \cdot NO_3] \\ + CO_3 \cdot Ba \end{matrix} = 2CO(NH_2)_2 + H_2O + CO_2 + Ba(NO_3)_2,$$

der in absolutem Alkohol löslich ist, während das bei der Reaktion gleichzeitig gebildete Baryumnitrat sowie das überschüssige Baryumcarbonat darin unlöslich sind.

2. Aus Kohlensäurephenylester. Dieser Ester wird im Wasserbade geschmolzen und trockenes Ammoniakgas darüber geleitet. Sobald sich das Ammoniak durch einen starken Geruch bemerkbar macht, gießt man die Schmelze in heißes Wasser; beim Erkalten sondert sich dann das Gemisch in eine dunklere Phenolschicht und eine wässerige Schicht, welche den Harnstoff gelöst enthält. (W. Hentschel[1]):



$$\begin{matrix} CO \cdot (OC_6H_5)_2 \\ + 2(NH_2 \cdot H) \end{matrix} = CO(NH_2)_2 + 2C_6H_5OH.$$

3. Aus cyansaurem Kalium. Man versetzt eine wässerige oder

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 17, 1284 (1884).

alkoholische Lösung von cyansaurem Kalium mit der äquivalenten Menge Ammoniumsulfat



$$\begin{matrix} 2CON\,K \\ + (NH_4)_2\,SO_4 \end{matrix} = K_2SO_4 + 2CONNH_4 \overset{\text{lagert sich}}{\underset{\text{um in}}{}} 2CO(NH_2)_2,$$

verdampft das Gemisch im Wasserbade zur Trockne und entzieht dem Rückstande mit absolutem Alkohol den Harnstoff; das gleichzeitig gebildete Kaliumsulfat bleibt hierbei ungelöst.

Entstehung des Harnstoffs im tierischen Organismus.

Es ist bis jetzt nicht geglückt, aus *Eiweiß* durch oxydative oder hydrolytische Prozesse Harnstoff direkt darzustellen. — Durch eine große Anzahl von Arbeiten zahlreicher Forscher ist aber nachgewiesen, daß es zweifelsohne *verschiedene* stickstoffhaltige Abbauprodukte vom Eiweiß sind, welche als die Muttersubstanzen, oder richtiger gesagt, als die Vorstufen des Harnstoffs angesehen werden müssen.

In erster Linie sind es diejenigen *Aminosäuren*, welche als Abbauprodukte des Eiweißes im Tierorganismus entstehen und daselbst, wenigstens zum Teil, in Harnstoff übergehen können. Dieser Uebergang von Aminosäuren in Harnstoff im lebenden tierischen Organismus ist bewiesen für Leucin, Glykokoll, die Asparaginsäure sowie das Asparagin. Diese Aminosäuren der Fettreihe werden im Organismus der Säugetiere als Harnstoff ausgeschieden. S. *Salaskin*[1]) hat mittelst Durchblutungsversuche an frisch herausgeschnittenen Hundelebern bewiesen, daß die Aminosäuren Glykokoll, Leucin und Asparaginsäure in der durchbluteten und überlebenden Leber in Harnstoff übergehen. Bei einem derartigen Versuche hat die Leber von dem hinzugesetzten Glykokoll 81,8% in Harnstoff umgewandelt, und von hinzugesetzter Asparaginsäure sind es 51,5% gewesen. Die Durchblutungsversuche von *Salaskin* zeigen auf jeden Fall, daß in der Leber *Harnstoff aus Aminosäuren* entstehen kann.

Als eine weitere Vorstufe des Harnstoffs, als ein Harnstoffbildner, muß das *Arginin* angesehen werden, welches bei der hydrolytischen Spaltung der Eiweißstoffe, z. B. bei der Trypsinverdauung derselben entsteht und das durch die in vielen Organen vorkommende *Arginase* in Harnstoff und Ornithin gespalten wird (s. oben). *Thomson*[2]) hat dann später auch nachgewiesen, daß Arginin im Hundekörper, und zwar per os oder subkutan appliciert, in Harnstoff umgewandelt wird. Es schien bei diesen Versuchen, als ob auch das Ornithin in Harnstoff übergeführt werde.

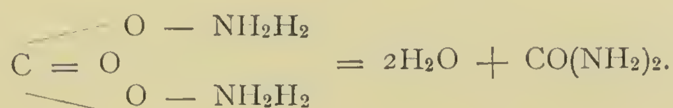
Ferner kann eine Harnstoffbildung aus *Ammoniak* und *kohlensaurem Ammonium* auf Grund der Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen verschiedener Forscher als erwiesen angesehen werden. Nicht nur *kohlensaures* und *carbaminsaures Ammonium*, sondern

---

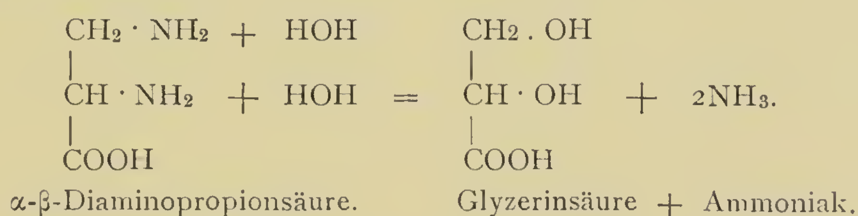
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 128 (1898).

[2]) Journ. of Physiolog. 32 und 33.

auch solche Ammoniumsalze organischer Säuren, welche im Tierkörper zu kohlensaurem Salz verbrannt werden, wie ameisensaures, essigsaures, weinsaures Ammonium werden im Organismus des Fleisch- wie Pflanzenfressers, wenigstens zum großen Teil, in Harnstoff umgewandelt. Die Bildung des Harnstoffs aus kohlensaurem Ammonium kann als eine unter Wasseraustritt erfolgende Synthese angesehen werden:



v. Schröder[1]) hat dann den Nachweis geführt, daß in der überlebenden und durchbluteten Hundeleber, durch die er mit ameisensaurem oder kohlensaurem Ammonium versetztes Blut hindurchleitete, eine Harnstoffbildung zustande kommt. — Auch aus den oben angeführten harnstoffbildenden Aminosäuren dürfte im Organismus zunächst Ammoniak abgespalten werden, welches in Blut und Geweben die zur Bildung von kohlensaurem oder auch carbaminsaurem Ammonium $CO(NH_2)(ONH_4)$ notwendige Kohlensäure schon vorfinden wird. Durch eine Reihe von Versuchen ist zudem nachgewiesen, daß Aminosäuren im Tierkörper Ammoniak abspalten, daß sie »desamidiert« werden. Aus Aminosäuren entstehen dann durch einen derartigen Desamidierungsprozeß Oxysäuren. Bei Fütterungsversuchen mit Alanin wurde im Harn reichlich Milchsäure aufgefunden (C. Neuberg und Langstein[2]), und P. Mayer[3]) hat durch Verfütterung von α, β-Diaminopropionsäure an Kaninchen durch vollständige Desamidierung aus deren Harn Glycerinsäure isolieren können:



α-β-Diaminopropionsäure. Glyzerinsäure + Ammoniak.

Endlich kann bei der physiologischen Harnstoffbildung im Tierkörper das carbaminsaure Ammonium[4]) in Betracht kommen. Drechsel[5]) hat die Entstehung dieses Salzes durch Oxydation von Aminosäuren in alkalischer Flüssigkeit festgestellt und das Vorhandensein desselben Salzes im Blutserum des Hundes und im alkalisch rea-

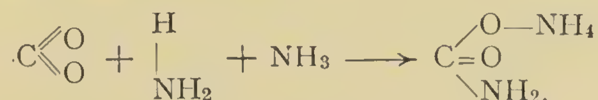
---

[1]) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 15.

[2]) Archiv f. Physiol. 1905 Suppl.

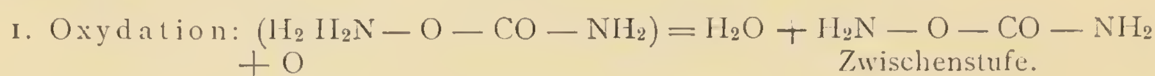
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 59 (1904).

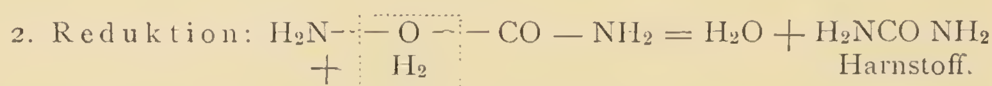
[4]) Carbaminsaures Ammonium entsteht bei der Vereinigung von Kohlendioxyd (1 Vol.) mit Ammoniakgas (2 Vol.), wenn beide Gase im vollkommen trockenen Zustande auf einander wirken:



[5]) Journ. f. prakt. Chem. (N. F.) 12, 417.

gierenden Harn des Pferdes nachgewiesen. Endlich ist es Drechsel geglückt, durch elektrische Wechselströme, also abwechselnde Oxydation und Reduktion, aus carbaminsaurem Ammonium Harnstoff darzustellen. Drechsel hat die von ihm gefundenen Tatsachen dahin zusammengefaßt, daß das durch Oxydation des Eiweißes und seiner näheren Abkömmlinge gebildete carbaminsaure Ammonium durch abwechselnde Oxydation und Reduktion, entsprechend der folgenden chemischen Gleichungen, in Harnstoff übergeführt werde:

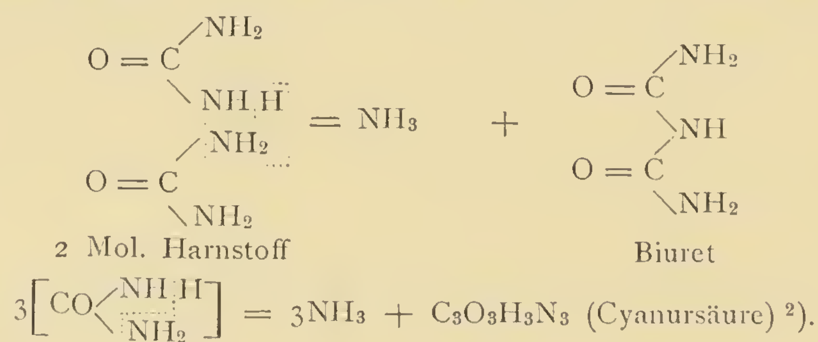




Neben dieser »Anhydridtheorie«, nach welcher Harnstoff aus kohlensaurem und carbaminsaurem Ammonium unter Wasseraustritt gebildet wird, besteht die von F. Hofmeister[1]) aufgestellte »Oxydationstheorie«, nach welcher bei der Oxydation stickstoffhaltiger Substanzen der amidhaltige Rest — $CO \cdot NH_2$ mit dem, bei der Oxydation des Ammoniaks hervorgehenden NH_2-Reste zu Harnstoff zusammentreten soll. Hofmeister hat nämlich bei der Oxydation verschiedener Aminosäuren sowie der Eiweißstoffe, bei Gegenwart von Ammoniak, Harnstoff erhalten und nimmt daher eine Harnstoffbildung durch Oxydationssynthese an.

Eigenschaften des Harnstoffs. Harnstoff kristallisiert aus Wasser und Alkohol in langen, quadratischen Säulen, die bei 132° schmelzen; schon eine geringfügige Verunreinigung des Harnstoffs kann den Schmelzpunkt erheblich ändern. Harnstoff sublimiert nur im Vacuum fast unzersetzt; er ist sehr leicht löslich in Wasser — bei 17,1° löst 1 ccm Wasser 1 g Harnstoff —, leicht löslich in Weingeist (1 : 5), aber unlöslich in Chloroform, reinem absolutem Aether und in Essigester; käuflicher Aether löst bei längerem Erhitzen unter Rückfluß geringe Mengen Harnstoff.

Beim Erhitzen über den Schmelzpunkt, von etwa 160° ab, zerfällt Harnstoff hauptsächlich in Ammoniak, Biuret und Cyanursäure:



$$3\left[CO\langle {NH.H \atop NH_2}\right] = 3NH_3 + C_3O_3H_3N_3 \text{ (Cyanursäure) }^{2)}.$$

---

[1]) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 37.

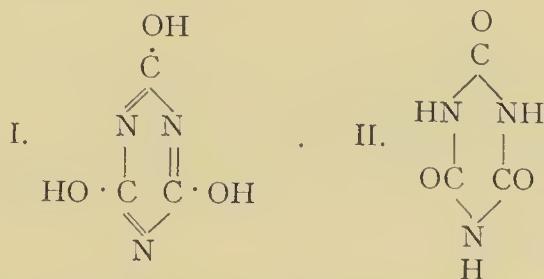
[2]) Cyanursäure gehört zu den tautomeren Substanzen; es leiten sich von ihr zwei Reihen von isomeren Alkoholderivaten ab, die als Derivate der normalen Cyanursäure (I) und der Isocyanursäure (II) von einander unterschieden werden:

Verhalten gegen Säuren. Harnstoff verhält sich wie eine einsäurige Base und verbindet sich als solche direkt mit 1 Aequivalent einer Säure zu meist kristallisierenden Salzen. Von diesen Salzen zeichnen sich besonders der salpetersaure Harnstoff $CO(NH_2)_2 \cdot HNO_3$ und der oxalsaure Harnstoff $[2CO(NH_2)_2 \cdot C_2O_4H_2]$ durch Kristallisationsvermögen und relative Schwerlöslichkeit aus.

Verbindungen mit Salzen. Harnstoff vereinigt sich mit verschiedenen Salzen zu häufig kristallisierenden Verbindungen. Harnstoff-Chlornatrium $CO(NH_2)_2 \cdot NaCl . H_2O$ scheidet sich manchmal beim Abdampfen des Harns zum Sirup und Stehenlassen kristallinisch ab und kristallisiert in rhombischen Tafeln oder Prismen. — Auch mit Chlorammonium und anderen Alkalisalzen kristallisiert Harnstoff aus solchen Lösungen aus, welche beide Stoffe gelöst enthalten. — Harnstoff-Palladiumchlorür $CO(NH_2)_2 \cdot PdCl_2$ fällt als bräunlichgelber, kristallinischer, schwer löslicher Niederschlag aus, wenn eine wässerige Harnstofflösung mit säurefreier Palladiumchlorürlösung versetzt wird. — Mit Mercurinitratlösung hat Liebig drei Verbindungen des Harnstoffs dargestellt, von welchen jeweils $[2CO(NH_2)_2 \cdot Hg(NO_3)_2]$ mit 1, 2 oder $3HgO$ verbunden sind und die alle drei weiße Niederschläge bilden. Die Verbindung $[2CO(NH_2)_2 \cdot Hg(NO_3)_2 \cdot 3HgO]$ erhält man durch Hinzufügen von überschüssiger, sehr verdünnter Mercurinitratlösung zu einer gleichfalls verdünnten wässerigen Harnstofflösung als ein weißes, körniges Pulver. Auf der Bildung dieses Niederschlags beruht das Liebigsche Verfahren der Titrierung des Harnstoffs. Der Niederschlag ist in Salpetersäure löslich; da bei seiner Bildung, wie aus der obigen Formel zu ersehen ist, freie Salpetersäure entsteht, fällt demnach nicht aller Harnstoff aus. Die Fällung des Harnstoffs durch Mercurinitrat wird aber, praktisch genommen, vollständig, wenn man die entstehende Salpetersäure mit Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat neutralisiert. Bei dieser Arbeitsweise läßt sich noch 1 mg Harnstoff in einem Liter seiner wässeriger Lösung nachweisen. Die drei Liebigschen Quecksilber-Harnstoffverbindungen werden, unter Wasser verteilt, durch Schwefelwasserstoff zerlegt, so daß man dann durch Verdunstenlassen des Filtrats vom Schwefelquecksilber reinen salpetersauren Harnstoff darstellen kann.

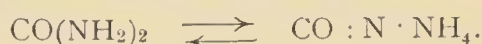
Bildung von cyansaurem Ammonium. Harnstoff ist in wässeriger Lösung wenig beständig, denn schon bei mittleren Tempera-

---



Es existiert aber nur eine Cyanursäure, welcher höchst wahrscheinlich Formel I zukommt.

turen erfolgt so lange eine Umwandlung desselben in das isomere cyansaures Ammonium, bis sich ein chemischer Gleichgewichtszustand eingestellt hat; diese Reaktion ist also umkehrbar

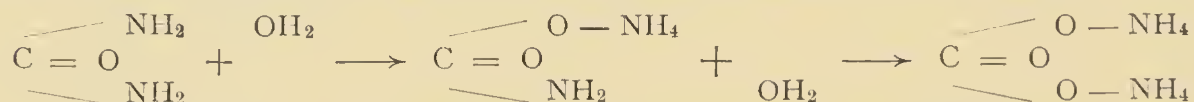


$$CO(NH_2)_2 \rightleftarrows CO:N \cdot NH_4.$$

Beim Erhitzen der wässerigen Harnstofflösung auf 100° tritt diese Umwandlung erheblich rascher ein und hat dann in ca. 1½ Stunden ihr Ende erreicht; es sind dann 5% des gelösten Harnstoffs in cyansaures Ammonium umgewandelt. Das letztere läßt sich mit Silbernitrat nachweisen, durch welches weißes Silbercyanat gefällt wird. Harnstofflösung gibt mit Silbernitrat keine Fällung.

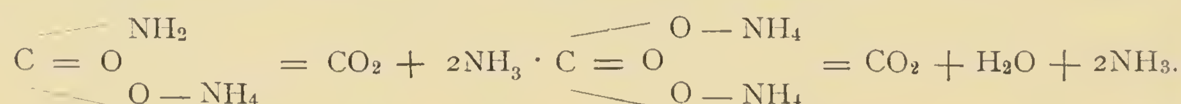
Verhalten des Harnstoffs zu Alkalilaugen, Säuren, Bakterien, Fermenten: Bildung von kohlensaurem Ammonium.

Wie alle Säureamide wird auch Harnstoff in wässeriger Lösung hydrolytisch gespalten. Unter Aufnahme von 1 Mol. Wasser entsteht zunächst carbaminsaures und alsdann kohlensaures Ammonium, indem ein weiteres Mol. Wasser aufgenommen wird.



$$C{=}O\begin{smallmatrix}NH_2\\NH_2\end{smallmatrix} + OH_2 \longrightarrow C{=}O\begin{smallmatrix}O-NH_4\\NH_2\end{smallmatrix} + OH_2 \longrightarrow C{=}O\begin{smallmatrix}O-NH_4\\O-NH_4\end{smallmatrix}$$

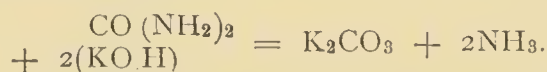
Unterhalb 50° ist der Harnstoff in wässeriger Lösung beständig; bei 60° entwickelt die Lösung schon deutlich Ammoniakgeruch; eine siedende wässerige Harnstofflösung gibt in 1½ Stunden 5,6% ihres Stickstoffs als Ammoniak ab (Berthelot und André[1]). Das durch die Hydrolyse des Harnstoffs zunächst gebildete carbaminsaure oder kohlensaure Ammonium zerfällt hierbei in Ammoniak, Kohlendioxyd und Wasser:



$$C{=}O\begin{smallmatrix}NH_2\\O-NH_4\end{smallmatrix} = CO_2 + 2NH_3 \cdot C{=}O\begin{smallmatrix}O-NH_4\\O-NH_4\end{smallmatrix} = CO_2 + H_2O + 2NH_3.$$

Eine wässerige Harnstofflösung mit 1—3% Harnstoff wird beim Erhitzen im Einschlußrohr auf 180° vollständig hydrolysiert.

Alkalilaugen und Mineralsäuren beschleunigen die Hydrolyse des Harnstoffs; kochende Alkalilauge zerlegt den Harnstoff glatt in Ammoniak und Kohlensäure:



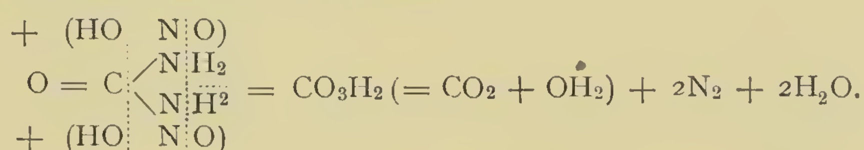
$$\begin{smallmatrix}CO(NH_2)_2\\+\ 2(KOH)\end{smallmatrix} = K_2CO_3 + 2NH_3.$$

Aetzbaryt, Aetzkalk (Kalkmilch) und Magnesiumoxyd wirken in der Kälte auf den Harnstoff nicht ein. — Konzentrierte starke Säuren zersetzen Harnstoff in der Kälte schon in erheblicherer Menge. Phosphorsäure zerlegt den Harnstoff bei Wasserbadtemperatur zu etwa 45%, bei 140—150° aber vollständig und zwar schon in 4—5 Stunden. Ebenso wirkt 2%ige Salzsäure im Einschlußrohr bei 130° sowie eine zum Sieden erhitzte Mischung aus kristallisiertem Magnesiumchlorid $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ und rauchender Salzsäure.

[1]) Bull. soc. chim. 47, 82 (1887).

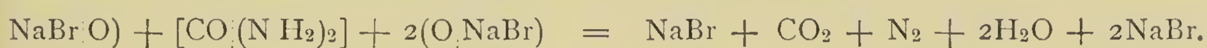
B a k t e r i e n u n d F e r m e n t e. Viele Bakterien, wie sie im faulen Harn, ferner im Harn bei Blasenkatarrh sich vorfinden, besonders Micrococcus ureae, bewirken die hydrolytische Spaltung des Harnstoffs. M u s k u l u s hat aus gährendem Harn von Personen, die an Blasenkatarrh erkrankt waren, durch Ausfällen mit Alkohol einen, ein F e r m e n t enthaltenden Niederschlag erhalten. Wurde dieser Niederschlag bei ganz gelinder Wärme getrocknet, dann mit kaltem Wasser ausgezogen und abfiltriert, so wurde ein klares Filtrat erhalten, welches, wie der Micrococcus ureae selbst, den Harnstoff in kohlensaures Ammonium überführte. Säuren, selbst sehr stark verdünnte, wie 0,1 %ige Salzsäure, Kochen oder längeres Erwärmen der Enzymlösung auf 50—80° zerstörten die Enzymwirkung der Lösung vollständig.

S a l p e t r i g e S ä u r e n und somit auch Alkalinitrit (KNO_2, $NaNO_2$) in Verbindung mit einer verdünnten Säure, zerlegen den Harnstoff in Stickstoff, Kohlendioxyd und Wasser:



$$\begin{matrix} + (HO & NO) \\ O = C\langle{}^{NH_2}_{NH_2} & \\ + (HO & NO) \end{matrix} = CO_3H_2 (= CO_2 + OH_2) + 2N_2 + 2H_2O.$$

N a t r i u m h y p o b r o m i t in wässeriger Lösung[1]) oxydiert den Harnstoff zu Kohlendioxyd, Stickstoff und Wasser:

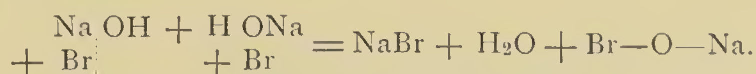


$$NaBrO) + [CO(NH_2)_2] + 2(ONaBr) = NaBr + CO_2 + N_2 + 2H_2O + 2NaBr.$$

Auf dieser Zerlegung des Harnstoffs durch Natriumhypobromit beruht die quantitative Bestimmung des Harnstoffs nach H ü f n e r. Die Zersetzung des Harnstoffs im Sinne der obigen Gleichung ist keine vollständige; je verdünnter die Harnstofflösungen und je konzentrierter die Bromlauge sowie die angewandte Alkalilauge sind, umso geringer ist der Verlust an Stickstoff. Die Erhöhung der Konzentration der Bromlauge übt auf die Verminderung des Verlustes an Stickstoff einen größeren Einfluß aus, als die Vermehrung des Broms. Verschiedene andere stickstoffhaltige Bestandteile des Harns, wie H a r n s ä u r e, A l l a n t o ï n, K r e a t i n, K r e a t i n i n, A m m o n i u m s a l z e sowie E i w e i ß entwickeln mit Bromlauge besonders beim Erwärmen ebenfalls mehr oder weniger leicht Stickstoff. J. F. E i j k m a n n[2]) hat durch Erwärmen mit Bromlauge aus Harnsäure 63 % und aus Chlorammonium sogar 99—99,2 % des vorhandenen Stickstoffs als solchen erhalten. Die Zersetzung des A m m o n i a k s durch die Bromlauge findet in der folgenden Gleichung ihren Ausdruck:

---

[1]) Man erhält eine derartige Lösung, kurz »B r o m l a u g e« genannt, durch Versetzen einer erkalteten Lösung von 100 g Aetznatron in 250 ccm Wasser mit 25 g Brom unter Abkühlen:



$$\begin{matrix} NaOH \\ + Br \end{matrix} + \begin{matrix} HONa \\ + Br \end{matrix} = NaBr + H_2O + Br{-}O{-}Na.$$

Der wirksame Bestandteil der Bromlauge ist das u n t e r b r o m i g s a u r e N a t r i u m.

[2]) Rec. trav. chim. des Pays-Bas 3, 125 (1884).

$$\begin{array}{l} 2N\vdots H_3 \\ + 3(O\ NaBr) \end{array} = N_2 + 3H_2O + 3NaBr.$$

Verhalten gegen siedenden Alkohol. Bei längerem Kochen alkoholischer Harnstofflösungen unter Rückfluß entsteht unter Abspaltung von Ammoniak in erheblicher Menge Urethan (A. W. Hofmann[1]):

$$O = C\begin{array}{l} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2 \end{array} = NH_3 + O = C\begin{array}{l} \diagup NH_2 \\ \diagdown O - C_2H_5. \end{array} = \text{Urethan}$$
$$+ C_2H_5O - H$$

M. Jaffé[2]) hat in alkoholischen Extrakten des Harns von Menschen, Hunden und Kaninchen beträchtlichere Mengen von Urethan aufgefunden, das aber in diesen Harnen nicht präformiert vorkommt, sondern beim Erhitzen der eingedampften Harne mit absolutem Alkohol als Kunstprodukt aus dem Harnstoff hervorgegangen ist.

Bildung von Phenylsemicarbazid mit Phenylhydrazin. Erhitzt man eine, mit Phenylhydrazin und mit Essigsäure (von 50%) bis zur stark sauren Reaktion versetzte wässerige Harnstofflösung 3 Stunden im Wasserbade, so scheidet sich bei langsamem Abkühlen und längerem Stehen Phenylsemicarbazid als gelber, aus mikroskopisch kleinen sechsseitigen rhombischen Blättchen bestehender Niederschlag aus. (M. Jaffé[3]):

$$C{=}O\begin{array}{l} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2 \end{array} + CH_3 \cdot COOH = C{=}O\begin{array}{l} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH \cdot NH \cdot C_6H_5 \end{array} + CH_3 \cdot COONH_4.$$
$$+ C_6H_5 \cdot NH \cdot NH\,H$$

Phenylhydrazin — Phenylsemikarbazid

Jaffé erhielt aus 50 ccm 2%iger wässeriger Harnstofflösung mit 10 ccm Phenylhydrazin + Essigsäure bis zur stark sauren Reaktion 2,12 g = 84,8% Phenylsemikarbazid. Aus menschlichem Harn erhält man das Phenylsemikarbazid meist nicht, wohl aber aus dem harnstoffreicheren Hundeharn nach vorausgegangenem eiweißreichem Futter. H. Milrath[4]) ist zu etwas anderen Resultaten gelangt wie Jaffé. Die Bildung des Phenylsemikarbazids soll nach Milrath auf den Uebergang des Harnstoffs in wässeriger Lösung in cyansaures Ammonium zurückzuführen sein. Kocht man Menschenharn mit Phenylhydrazin + Essigsäure, so ist nach 10 Stunden das Ende der Bildung von Phenylsemikarbazid erreicht, und es haben sich dann ca. 80% des Harnstoffs in diese Verbindung umgesetzt. Wässerige Harnstofflösungen lieferten bei 3stündigem Erwärmen auf dem Wasserbade Acetylphenylhydrazin $CH_3 \cdot CO \cdot NH \cdot NH \cdot C_6H_5$, oder im besten Falle ein Gemisch dieses mit Phenylsemikarbazid.

Nachweis des Harnstoffs im Harn.

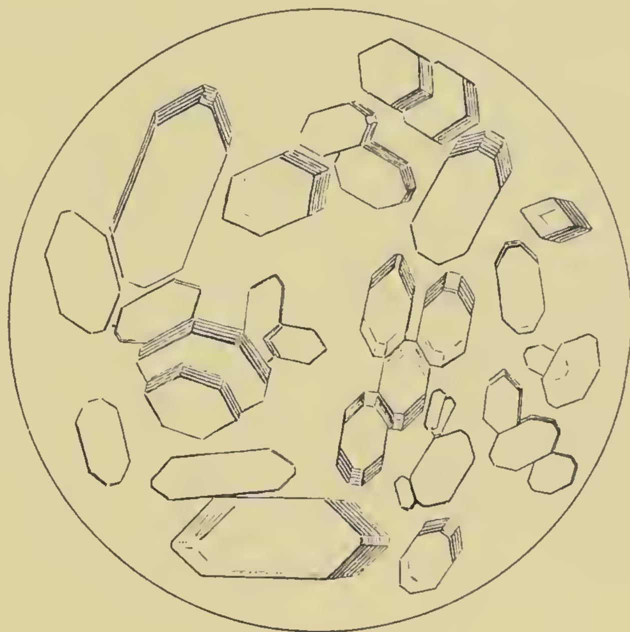
Direkt im Harn läßt sich Harnstoff nicht sicher nachweisen; er muß zu seinem sicheren Nachweise auf chemischem Wege erst in möglichst reinem Zustande aus dem Harn dargestellt werden. In vielen Fällen ge-

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 4, 268 (1871).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 395 (1890).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 532 (1896/97).
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 126 (1908).

nügt es, 50—100 ccm Harn in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup einzudunsten, den Rückstand mit etwa der 5-fachen Menge absolutem Alkohol auszuziehen und den abfiltrierten alkoholischen Auszug wiederum auf dem Wasserbade zu verdunsten. Die beim Stehenlassen des Verdunstungsrückstandes in der Kälte, am besten im Eisschranke, sich ausscheidenden, meist gefärbten Kristalle werden durch Abtropfenlassen von anhaftender Mutterlauge möglichst befreit, zweckmäßigerweise legt man sie auf einen Thonteller, der die Mutterlauge aufsaugt, dann in der folgenden Weise als Harnstoff identifiziert:

1. Harnstoffnitrat. Man löst einen Teil der Kristalle in wenig Wasser und tropft ein wiedererkaltetes Gemisch aus gleichen Volumen konz. Salpetersäure (Dichte 1,414 = ca. 68 % HNO_3) und Wasser hinzu; es scheidet sich salpetersaurer Harnstoff in glänzenden, rhombischen oder sechsseitigen Kristalltafeln aus. Vergl. Fig. 15. Die Grundform der Kristalle ist eine rhombische Tafel, von welcher der eine Winkel 82° beträgt und die durch Abstumpfung der spitzen Winkel zur sechsseitigen Tafel wird. Da der salpetersaure Harnstoff in reinem Wasser leicht, in salpetersäurehaltigem Wasser aber schwer löslich ist, so verwende man zu seiner Fällung einen Ueberschuß von nicht zu verdünnter Salpetersäure. Zum Nachweis sehr kleiner Harnstoffmengen bringt man ein Kriställchen desselben auf einen Objektträger, löst es in einem Tröpfchen Wasser, fügt 2 Tropfen Salpetersäure obiger Konzentration hinzu und beobachtet die sich ausscheidenden Kriställchen unter dem Mikroskope.

Fig. 15.



2. Harnstoffoxalat. Man versetzt die konzentrierte wässerige Lösung der erhaltenen Harnstoffkristalle mit einer ebenfalls konzentrierten wässerigen Lösung von Oxalsäure; es scheidet sich oxalsaurer Harnstoff in rhombischen Tafeln oder dicken rhombischen Prismen aus; er ist in Wasser leichter löslich als in einer wässerigen Oxalsäurelösung.

3. Salpetrigsäureprobe. Man versetzt die wässerige Lösung der erhaltenen Kristalle erst mit wenig Natriumnitritlösung, dann mit verdünnter Schwefelsäure oder Essigsäure; es entweichen unter Aufschäumen farblose Gase, nämlich ein Gemisch von Stickstoff und Kohlendioxyd. Bei Abwesenheit von Harnstoff treten gelbe oder gelbbraune nitrose Dämpfe auf[1]).

[1]) Die aus den Alkalinitriten durch Säuren zunächst freigemachte salpetrige

4. Biuretprobe. Man trocknet die aus dem Harn erhaltenen Kristalle auf einem Tonteller, oder preßt sie zwischen Filtrierpapier aus, erhitzt sie dann in einem trockenen Reagensgläschen über einer kleinen Flamme so lange zum Schmelzen, bis reichlich Ammoniak entwichen ist, läßt abkühlen, löst den Rückstand in stark verdünnter Natronlauge und fügt 2 Tröpfchen stark verdünnter Kupfersulfatlösung hinzu. Die Lösung färbt sich hierbei durch das aus dem Harnstoff gebildete Biuret rotviolett, später mehr blauviolett.

5. Furfurolprobe nach H. Schiff[1]). Uebergießt man einige von den, aus dem Harn erhaltenen Harnstoffkriställchen erst mit einem Tropfen fast gesättigter, wässeriger Furfurollösung, dann sofort mit einem Tropfen Salzsäure (Dichte 1,1 = 20% HCl), so nimmt das Gemisch sehr rasch eine, durch Gelb und Grün in Blau und Violett übergehende prachtvolle purpurrote Färbung an.

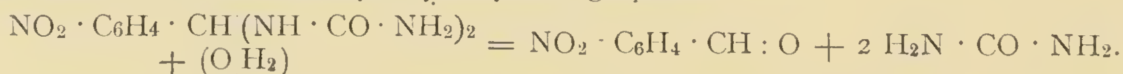
Oder man mischt 1 Tropfen der Harnstofflösung mit 1/2 ccm gesättigten Furfurolwasser und einigen Tropfen konz. Salzsäure. Das Gemisch färbt sich im Laufe von 5 Minuten prächtig purpurviolett oder purpurrot. Von anderen Harnbestandteilen gibt außer Harnstoff nur das Allantoïn die gleiche Färbung, wenn auch weniger rasch und weniger intensiv als Harnstoff.

6. Die Probe mit Ortho-Nitrobenzaldehyd nach Lüdy[2]). Läßt man in einem Porzellanschälchen eine Mischung der alkoholischen Lösungen von den erhaltenen Harnstoffkristallen und O-Nitrobenzaldehyd $NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CHO(1,2)$ auf einem Wasserbade eindunsten, übergießt den erhaltenen Rückstand wiederholt (2—3 Mal) mit warmem Alkohol, d. h. so oft bis der im Ueberschusse zugesetzte O-Nitrobenzaldehyd entfernt ist — was daran zu erkennen ist, daß der abgegossene Alkohol mit Phenylhydrazin keine rote oder orange Färbung mehr gibt —, so hinterbleibt eine an den Wandungen des Porzellanschälchens fest haftende, weißliche, pulverige Substanz, nämlich das Ortho-Nitrobenzylidendiureïd, das nach der folgenden Gleichung entsteht:



$$NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH\,O + 2H\,NH \cdot CO \cdot NH_2 = H_2O + NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH\,(NH \cdot CO \,.\, NH_2)_2$$

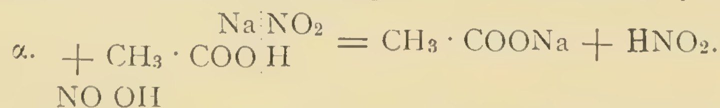
Dieses Diureïd vom Schmelzpunkt 200° ist nur wenig löslich in Wasser, Alkohol sowie Aether und wird durch Kochen mit 10%iger Schwefelsäure in Harnstoff und O-Nitrobenzaldehyd hydrolytisch gespalten:



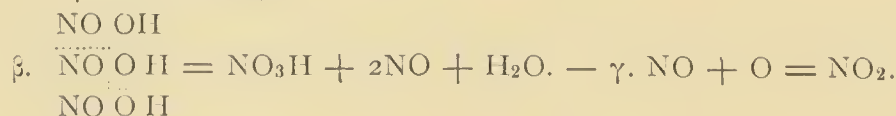
$$\begin{matrix} NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH\,(NH \cdot CO \cdot NH_2)_2 \\ + (O\,H_2) \end{matrix} = NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH : O + 2\,H_2N \cdot CO \cdot NH_2.$$

Erhitzt man daher den erhaltenen und mit warmem Alkohol ausgewaschenen Rückstand im Porzellanschälchen mit einigen Tropfen 10%iger Schwefelsäure und

Säure (α) zersetzt sich sofort nach β und das hierbei gebildete Stickoxyd gibt mit dem Luftsauerstoff gelbbraune Dämpfe von Stickstoffdioxyd (γ).



$$\alpha.\quad \begin{matrix} Na\,NO_2 \\ + CH_3 \cdot COO\,H \end{matrix} = CH_3 \cdot COONa + HNO_2.$$

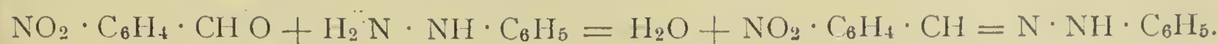


$$\beta.\quad \begin{matrix} NO\,OH \\ NO\,O\,H \\ NO\,O\,H \end{matrix} = NO_3H + 2NO + H_2O. \quad \text{—}\ \gamma.\ NO + O = NO_2.$$

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 10, 773 (1877).

[2]) Monatshefte für Medizin 10, 303, 310 (1890).

wenig einer verdünnten wässerigen Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin zum Sieden, so färbt sich das Gemisch durch gebildetes O-Nitrobenzaldehydphenylhydrazon sogleich rot oder orangefarben:



$$NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CHO + H_2N \cdot NH \cdot C_6H_5 = H_2O + NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH = N \cdot NH \cdot C_6H_5.$$

Bemerkung. Da der Nachweis des Harnstoffs in diesem Falle ein indirekter ist, indem ja der aus dem Diureïd abgespaltene O-Nitrobenzaldehyd nachgewiesen wird, so ist es selbstverständlich, daß vor dem Anstellen der Schlußreaktion der im Ueberschusse zugesetzt gewesene, also nicht gebundene O-Nitrobenzaldehyd mit Alkohol vollständig entfernt werden muß.

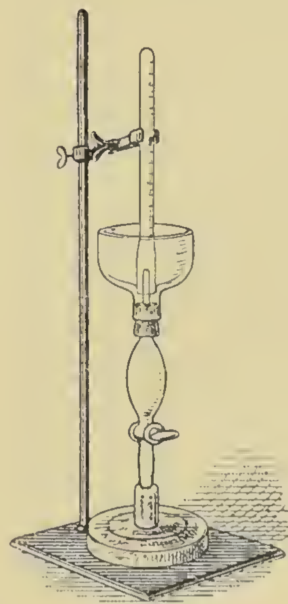
Quantitative Bestimmungen des Harnstoffs im Harn.

1. Die Bestimmung nach Knop-Hüfner.

Nach dieser Methode wird der Harnstoff des Harns mit »Bromlauge« (s. oben) zersetzt, der sich hierbei entwickelnde Stickstoff in einer graduierten Röhre über gesättigter Kochsalzlösung aufgefangen, gemessen und auf Harnstoff umgerechnet. Diese Methode ist für praktische Zwecke hinreichend genau, für genauere wissenschaftliche Untersuchungen aber nicht geeignet, da sich einerseits geringe Mengen von Harnstoff der Einwirkung der Bromlauge entziehen und andererseits auch andere stickstoffhaltige Bestandteile des Harns, wie Harnsäure, Kreatinin und Ammoniumsalze durch Bromlauge unter allmählicher Entwicklung von Stickstoff ebenfalls zerlegt werden. — So erhielt Eijkmann bei der Einwirkung der Bromlauge in der Wärme aus Ammoniak 99,0—99,2 % seines Stickstoffs, aus Harnsäure 63 % und aus Kreatin 68 % ihres Stickstoffs. Bei der Einwirkung in der Kälte wird freilich aus diesen Stoffen durch Bromlauge erheblich weniger Stickstoff frei.

Erfordernisse. 1. Der Apparat von Knop-Hüfner (Fig. 16). 2. Bromlauge. Man löst 100 g Aetznatron in 250 ccm Wasser und fügt zu der erkalteten Lauge unter Abkühlen 25 ccm Brom. Die Bromlauge ist nur einige Tage haltbar und wird daher für jeden Versuch frisch bereitet. 3. Gesättigte Kochsalzlösung.

Fig. 16.



Apparat für die Bestimmung des Harnstoffs nach Knop-Hüfner.

Ausführung. Man verdünnt den zu untersuchenden Harn mit dem doppelten Volumen Wasser, bringt diesen verdünnten Harn in eine Bürette, läßt 5 ccm desselben mit Hilfe eines langen Trichterrohres in das unterste Gefäß des Apparates fließen und füllt dieses wie auch die Durchbohrung des Hahns, unter Nachspülen des Trichterrohrs, mit Wasser auf. Nun schließt man den Hahn, füllt das mittlere, bauchig erweiterte Gefäß vollständig mit Bromlauge und die Schale sowie das graduierte Rohr mit gesättigter Kochsalzlösung und stülpt dann das letztere über die Mündung des mittleren Gefäßes. Hierbei muß

man darauf achten, daß keine Luftblase in das graduierte Rohr gelangt. Nun wird der Hahn vollständig geöffnet, so daß die Bromlauge sich möglichst vollständig mit dem Harn mengen kann. Es tritt sofort eine stürmische Gasentwicklung ($N + CO_2$[1]) ein, die sich bald verlangsamt, aber erst nach 20—30 Minuten ganz aufhört. Nach Beendigung der Gasentwicklung verschließt man die Oeffnung des Absorptionsrohres unter der Kochsalzlösung mit dem Finger, führt das Rohr in einen weiteren, mit Wasser gefüllten Glascylinder so über, daß sich das Niveau im Innern des Glasrohrs in gleicher Höhe mit dem Wasserspiegel befindet und liest nach etwa ½ Stunde das Volumen des Stickstoffs in ccm ab (v), ferner die Temperatur der Luft über dem Wasser dicht neben dem Absorptionsrohr (t) und den Barometerstand (b). Die der abgelesenen Temperatur t entsprechende Tension der Wasserdämpfe (b') entnimmt man einer Tabelle.

Berechnung. Bezeichnet a die Menge des untersuchten Harns, so ergibt sich der Prozentgehalt des Harns an Harnstoff (p), wenn man nach der folgenden zusammengezogenen Formel rechnet:

$$p = \frac{100 \text{ v } (b - b')}{760 \cdot 354{,}33 \cdot a \, (1 + 0{,}003665 \cdot t)}$$

2. Die Bestimmung nach Mörner-Syöqvist, modifiziert von O. Folin[2]).

Man fällt aus dem Harne mit Hülfe von Aetzbaryt unter gleichzeitigem Zusatze eines Alkohol-Aethergemisches verschiedene stickstoffhaltige Bestandteile des Harns wie Harnsäure, Purinbasen, Oxyproteïnsäure, Eiweiß, Tyrosin, die Hauptmenge des Allantoins aus, während außer Harnstoff noch Ammoniak, Hippursäure, Kreatinin und Spuren von Allantoin gelöst bleiben. Bestimmt man dann in dem eingeengten Filtrate, nach dem Austreiben des Ammoniaks durch Eindampfen mit gebrannter Magnesia, den Harnstoff nach Kjeldahl, so begeht man in Folge von anwesender Hippursäure und Kreatinin einen, wenn auch nur kleinen Fehler. Dieser Fehler wird vermieden, wenn man nach der von O. Folin angegebenen Methode arbeitet, die darauf beruht, daß beim Erhitzen des Rückstandes mit einem Gemische aus kristallisiertem Magnesiumchlorid $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ und konzentrierter Salzsäure, wobei eine Temperatur von 150—155° erreicht wird, nur der Harnstoff vollständig in Kohlensäure und Ammoniak zerlegt wird, nicht aber die anderen, noch vorhandenen stickstoffhaltigen Bestandteile des Harns. Folin hat dieses Verhalten nachgewiesen für Hippursäure, Harnsäure, Glykokoll, Kreatin und somit auch für Kreatinin, da ja Kreatin beim Kochen mit konz. Salzsäure in Kreatinin übergeführt wird. Alle diese Stoffe lieferten dabei keine in Betracht kommenden Ammoniakmengen. Eine Ausnahme bildet freilich das Allantoin, das aber ja schon vor-

[1]) Das Kohlendioxyd, welches bei der Einwirkung der Bromlauge auf den Harnstoff neben Stickstoff entsteht, wird von dem überschüssigen Aetznatron der Bromlauge sofort gebunden: $CO_2 + 2NaOH = Na_2CO_3 + H_2O$.

[2]) Zeitschr. f physiol. Chem. 32, 504 (1901), 36, 333 (1902), 37, 548 (1902/3).

her bis auf Spuren entfernt wird. — Nach erfolgter Hydrolyse wird das aus dem Harnstoff hervorgegangene Ammoniak, nach dem Alkalisieren, abdestilliert und in der üblichen Weise in einer abgemessenen Menge $^1/_5$ n-Schwefelsäure aufgefangen.

Ausführung. Man versetzt 5 ccm Harn[1]) zuerst mit 1,5 g fein gepulvertem Aetzbaryt, dann, nachdem dieser beim Umschwenken sich größtenteils gelöst hat, mit 100 ccm eines Alkohol-Aethergemisches[2]) schüttelt um und läßt verschlossen bis zum nächsten Tage stehen. Nun wird der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit Alkohol-Aethergemisch ausgewaschen und der Aether-Alkohol aus dem klaren Filtrate bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur auf dem Wasserbade abdestilliert, was ungefähr 1 Stunde beansprucht. Die zurückbleibende Flüssigkeit bringt man unter Nachspülen mit ca. 2 ccm Wasser ohne Verlust in einen Erlenmeyerkolben von 200 ccm Inhalt und trocknet im Wasserbade ein; durch Aussaugen der Dämpfe mit Hülfe einer Wasserstrahlpumpe wird das Eintrocknen beschleunigt, das aber trotzdem $1^1/_4$ bis $1^1/_2$ Stunden Zeit in Anspruch nimmt. Nun bringt man 20 g kristallisiertes Magnesiumchlorid sowie 2 ccm konzentrierte Salzsäure vom spez. Gew. 1,124 in den Erlenmeyerkolben und kocht das Ganze auf einem Drahtnetze 2 Stunden über kleiner Flamme und zwar unter Zugabe von Siedesteinchen und Verwendung des von Folin empfohlenen Sicherheitsrohres oder unter Anwendung eines Rückflußkühlers. Die noch heiße Mischung wird dann mit Wasser auf ca. 500 ccm verdünnt, mit 10 ccm Natronlauge (von 20% NaOH) sowie mit Siedesteinchen versetzt, das Ammoniak aus ihr in der üblichen Weise sofort abdestilliert und in 40 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure aufgefangen. Selbstverständlich muß der Destillationsapparat fix und fertig sein, ehe das Reaktionsgemisch mit Natronlauge alkalisch gemacht wird. Nach O. Folin ist ein längeres Destillieren erforderlich, bis alles Ammoniak übergetrieben ist. Die Destillation beansprucht mindestens eine Stunde.

Bemerkungen. Das käufliche Magnesiumchlorid enthält meist Spuren von Ammoniak. Man bestimme daher die in 20 g des Salzes vorhandene Menge Ammoniak und ziehe sie von der im Harn gefundenen Menge Ammoniak ab.

Für das im Harne vorhandene präformierte Ammoniak muß selbstverständlich ebenfalls eine Korrektur angebracht werden. Man bestimme daher nebenher in einer neuen Menge desselben Harns das präformierte Ammoniak nach Schlösing, M. Krüger oder Folin und ziehe dieses Ammoniak ebenfalls von der beim eigentlichen Versuche gefundenen Menge Ammoniak ab. — Bei zuckerreicheren Harnen müssen statt 1,5 g 2 g fester Aetzbaryt genommen werden, so daß der Zucker vollständig entfernt wird, andernfalls würden die aus dem Zucker sich bildenden Huminsubstanzen Stickstoff aufnehmen und zurückhalten.

Die Berechnung ist einfach. Da 1 Mol. Harnstoff (60) bei der Hydrolyse

---

[1]) Man messe diese Menge Harn so genau wie möglich in einer Bürette ab. Man bedenke, daß ein Fehler von nur 1 Tropfen im Abmessen auf die Tagesmenge Harn bezogen einen solchen von 300 Tropfen bedingen kann.

[2]) Eine Mischung aus 65 ccm Alkohol und 35 ccm Aether.

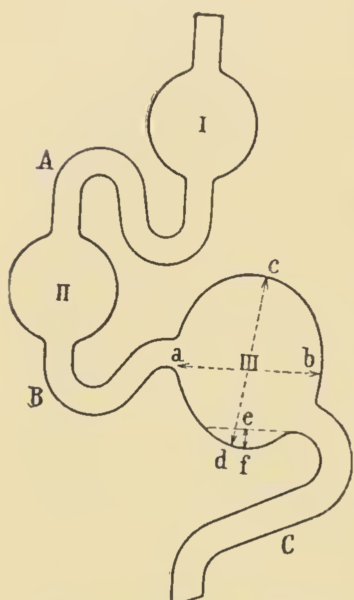
2 Mol. Ammoniak liefert, so entsprechen 1000 ccm $^1/_1$ n-Schwefelsäure $\frac{CO(NH_2)_2}{2} = \frac{60}{2} = 30$ g Harnstoff und 1000 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure somit $\frac{30}{5} = 6$ g Harnstoff.

1 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure zeigt somit 0,006 g = 6 mgr Harnstoff an.

3. Die vereinfachte Bestimmung nach O. Folin[1]).

3 ccm Harn, 20 g kristallisiertes Magnesiumchlorid und 2 ccm rauchende Salzsäure werden in einem Erlenmeyerkolben von 200 ccm Inhalt unter Benutzung des von Folin oder besser des von Cathcart (s. unten) empfohlenen Rückflußrohres (vgl. Fig. 17) gekocht, bis die aus dem Rohre zurückfließenden Tropfen in der Mischung, welche sich in dem Erlenmeyerkolben befindet, ein zischendes Geräusch verursachen. Das Kochen wird dann in mäßiger Weise, aber mit kleinerer Flamme, noch 40 bis 45 Minuten fortgesetzt. Um das Schäumen bei diesem Kochen, wie auch bei der darauf folgenden Destillation zu verhindern, empfiehlt sich der Zusatz eines Stückchens Paraffin. Nach dem Kochen wird die noch heiße Flüssigkeit mit 500 ccm Wasser in einen Destillationskolben aus Jenaer Glas hineingespült, sodann das Ammoniak nach dem Alkalisieren mit 7—8 ccm (nicht mehr) Natronlauge von 20% NaOH in der üblichen Weise abdestilliert und in 30 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure aufgefangen. Die Destillation dauert hierbei mindestens eine Stunde, bis alles Ammoniak übergegangen ist.

Fig. 17.



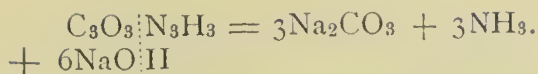
Rückflußrohr nach Cathcart.

Berechnung wie oben. Die Korrekturen für den Ammoniakgehalt des angewandten Magnesiumchlorids sowie für das präformierte Ammoniak des Harns müssen gesondert ermittelt werden (Vergl. Methode 2.)

Bemerkungen. Kreatinin, Harnsäure und Hippursäure liefern nach diesem Verfahren kein Ammoniak. Außer Harnstoff wird nur noch das Allantoin unter Bildung von Ammoniak zerlegt. Der normale Menschenharn enthält aber nur solche Spuren Allantoin, daß diese nicht in Betracht kommen. Man kann also mit vollem Rechte behaupten, daß nach der Folin'schen Methode nur der Harnstoff des Harns bestimmt wird. Anwesenheit von Traubenzucker (s. oben) läßt aber die Harnstoffwerte häufig zu niedrig ausfallen.

Die lange Destillationsdauer von mindestens einer Stunde, die für das Abdestillieren des Ammoniaks erforderlich ist, führt Folin darauf zurück, daß beim Kochen des Harns mit Magnesiumchlorid und rauchender Salzsäure schließlich Wasser fehlt, so daß der Harnstoff zum Teil in Cyanursäure übergeführt wird, eine Säure, die ja auch beim Erhitzen von trockenem Harnstoff entsteht. Die Cyanursäure $C_3O_3N_3H_3$ wird während der Destillation mit der verdünnten Natronlauge zwar quantitativ, aber äußerst langsam in Kohlensäure und Ammoniak gespalten

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 504 (1901) und 36, 333 (1902).



$$C_3O_3N_3H_3 + 6NaOH = 3Na_2CO_3 + 3NH_3.$$

So erklärt es sich, daß es nicht möglich ist, das aus dem Harnstoff entstehende Ammoniak in weniger als in einer Stunde abzudestillieren. Folin gibt an, daß für gewöhnlich etwa 350 ccm abdestilliert werden müssen, bevor alles Ammoniak ausgetrieben ist.

E. P. Cathcart[1]) hat das Folin'sche Sicherheitsrohr modifiziert, wie aus Abbildung 17 zu ersehen ist. In die Kugel III kommt vor Beginn der Hydrolyse etwas Salzsäure, so daß unter Verwendung dieses Aufsatzes ein völliges Verdampfen der Salzsäure und ein Alkalischwerden des Hydrolysates ausgeschlossen ist.

Kristallisiertes Magnesiumchlorid $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ schmilzt in seinem Kristallwasser bei 112—115°; die Schmelze hat einen Siedepunkt von etwa 160°. Eine solch siedende Schmelze spaltet den Harnstoff schon in kurzer Zeit (1/2 Stunde) quantitativ in Kohlensäure und Ammoniak.

Kreatinin und Kreatin.

Kreatinin $C_4H_7N_3O$ ist ein normaler Bestandteil des Menschenharns; die Menge Kreatinin, welche in 24 Stunden mit dem Harn ausgeschieden wird, ist beim gesunden Menschen für jedes Individuum ziemlich konstant und scheint von der Gesamtstickstoffausscheidung wenig abhängig zu sein, wenigstens ist dies bei fleischfreier Kost der Fall. Die pro Kilogramm Körpergewicht ausgeschiedene Menge Kreatininstickstoff schwankt beim gesunden Menschen zwischen 7—11 mg Stickstoff oder zwischen 19—30 mg Kreatinin. Für einen 80 kg schweren Menschen ergibt sich demnach eine Menge von 1,52—2,4 g Kreatinin für die Tagesmenge Harn. Im Hungerzustande sinkt die Kreatininausscheidung allmählich.

Unsere Nahrung enthält nur Spuren von Kreatinin (z. B. Fleischextrakt); bei Weitem die größte Menge des im Harne vorkommenden Kreatinins muß also im Körper selbst gebildet werden, also endogenen Ursprungs sein. Am naheliegendsten ist die Annahme, daß Kreatinin aus dem Kreatin hervorgehe. Die Entstehung von Kreatinin auf diese Weise in der Leber ist durch die Versuchsergebnisse verschiedener Forscher wahrscheinlich gemacht[2]). Die durchblutete Hundeniere wandelt ebenso wie die Leber Kreatin in ihr Anhydrid Kreatinin um, zerstört aber auch Kreatin und Kreatinin. Im Fieberzustande steigt die Kreatininausscheidung, ohne daß sich ein Parallelismus mit der Gesamtstickstoffausscheidung nachweisen ließe. Besonders starke Verminderung in der Kreatininausscheidung, nur 0,11 g Kreatinin in der Tagesmenge Harn, hat man bei manchen Erkrankungen der Leber beobachtet.

Kreatin $C_4H_9N_3O_2$ wird im Harn des gesunden Menschen bei kreatin-, d. h. fleischfreier Kost nicht oder nur in ganz geringer

---

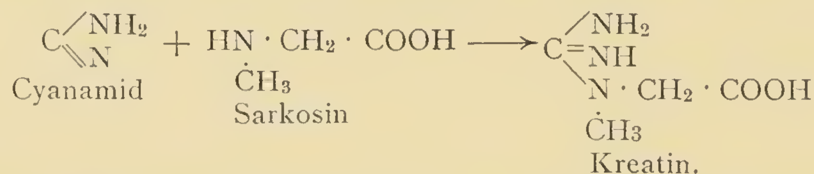
[1]) Biochemische Zeitschr. 6, 147 (1907).

[2]) Gottlieb und Stangessinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 1 (1907), 55, 322 (1908). Van Hoogenhuyze und Verploegh, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 161 (1908) und 59, 101 (1909).

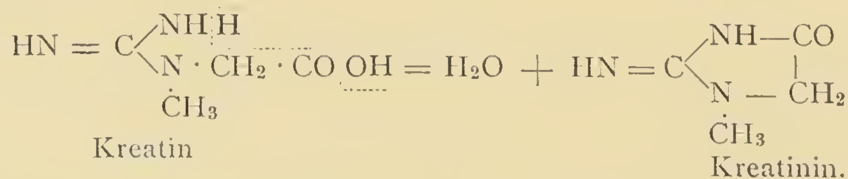
Menge ausgeschieden. Findet sich Kreatin in der Nahrung vor, so geht ein Teil desselben unverändert in den Harn über, und zwar scheint dieser Bruchteil bei ungenügender Eiweißzufuhr kleiner als bei reichlicherem Eiweißgenusse zu sein. Nach van Hoogenhuyze und Verploegh (l. c.) erscheint ein Teil des verabreichten Kreatins bald als solches, bald als Kreatinin im Harn, ohne daß die Eiweißzufuhr von ausschlaggebender Bedeutung wäre. — Im Hungerharn soll Kreatin regelmäßig vorhanden sein, und zwar in Mengen von 0,15—0,3 g in der Tagesmenge Harn. Bei vielen Krankheiten hat man eine vermehrte Kreatinausscheidung beobachtet, die durch Einschmelzung von Muskelgewebe wie auch durch verminderte Umwandlung von Kreatin in Kreatinin bedingt sein kann. (v. Hoogenhuyze und Verploegh.) In einigen Fällen mit Zerfall von Muskelgewebe und verminderter Muskeltätigkeit wurde neben wenig Kreatinin relativ viel Kreatin mit dem Harn ausgeschieden. Bei verschiedenen Personen wurde die Ausscheidung von Kreatin und Kreatinin durch zugeführtes Eiweiß in dem Sinne beeinflußt, daß Beide bei höherer Eiweißzufuhr auch in größerer Menge ausgeschieden wurden. Bei akutem Fieber und schwerem Diabetes fand Shaffer bis 0,6 g und bei einem Typhus sogar 2 g Kreatin in der 24stündigen Harnmenge. Bei Carcinomen mit starker Leberzerstörung kamen Kreatinmengen bis zu 4 g vor.

Im Unterschiede zur Kreatinausscheidung scheint die Kreatininausscheidung beim gesunden Menschen konstant und unabhängig von der Gesamtstickstoffausscheidung zu sein.

Künstliche Darstellung von Kreatin und Kreatinin. Kreatin wird künstlich erhalten, wenn man eine gesättigte Lösung von Sarkosin mit Cyanamid und einigen Tropfen Ammoniak in der Kälte sich selbst überläßt (Strecker 1868), oder ein Gemisch von Sarkosin, Cyanamid und Alkohol auf 100° erhitzt (Vollhard 1869):



Erwärmt man Kreatin mit einer verdünnten Mineralsäure, so geht es unter Verlust von 1 Mol. Wasser und unter Ringschluß in Kreatinin über:



Eine teilweise Ueberführung des Kreatins in Kreatinin erfolgt schon beim Erhitzen mit Essigsäure. Die umgekehrte Reaktion, nämlich die Umwandlung des Kreatinins in Kreatin, erfolgt beim Erwärmen der alkalischen Kreatininlösungen wie auch schon durch kaltes Barytwasser.

Darstellung des Kreatinins aus Harn. Von den verschiedenen

Methoden, welche für die Gewinnung des Kreatinins aus Harn ausgearbeitet sind, kann die von O. Folin[1]) angegebene empfohlen werden. Sie gründet sich auf die Fällbarkeit des Kreatinins durch Pikrinsäure; der hierbei aus dem Harne erhaltene Niederschlag besteht bis zu 90 % aus dem von Jaffé beschriebenen Doppelpikrat aus Kreatinin und Kalium.

Man gießt eine heiße Lösung von 18 g Pikrinsäure in 50 ccm Alkohol unter kräftigem Umrühren in 1 Liter Harn und setzt das Umrühren, ohne die Wände des Gefäßes zu berühren, einige Minuten lang fort, d. h. so lange, bis die Ausfällung des Pikrats beginnt. Nach ca 3/4 Stunden ist fast alles Kreatinin in dem entstandenen schweren, sandigen Bodensatz enthalten; die Flüssigkeit ist aber noch durch ausfallende Harnsäure meist mehr oder weniger getrübt; diese Flüssigkeit wird nun abgehebert oder vorsichtig abgegossen, der Bodensatz auf einem Saugfilter gesammelt, mit gesättigter Pikrinsäurelösung gründlich ausgewaschen und gut abgesaugt; dann wird er noch feucht gewogen und mit halbsoviel Kaliumbikarbonat ($KHCO_3$)[2]) sowie mit 50 ccm Wasser auf 1 Liter des angewandten Harns während 1 Stunde in einer großen Reibschale verrieben. Hierdurch geht das Kreatinin quantitativ in Lösung, während die Pikrinsäure in ihr schwer lösliches Kaliumsalz übergeführt wird; letzteres wird abgesaugt, mit wenig Kaliumbikarbonatlösung gewaschen, das gesamte Filtrat mit 20%iger Schwefelsäure vorsichtig neutralisiert oder ganz schwach angesäuert, dann mit 2 Vol. Methyl- oder Aethylalkohol versetzt und sogleich, ohne abzufiltrieren, mit kleinen Mengen Tierkohle entfärbt. Nach einigen Minuten wird der aus Kohle und Kaliumsulfat bestehende Niederschlag abfiltriert, das meist noch schwach gelb gefärbte Filtrat bis zum nächsten Tage stehen gelassen, dann nochmals filtriert. Um aus diesem Filtrate die Kreatininbase rein zu erhalten, ist die Ueberführung in ihr Chlorzinkdoppelsalz notwendig. Zu dem Zweck wird das Filtrat mit konzentrierter Chlorzinklösung allmählich und so lange versetzt, als noch eine Fällung entsteht, dann bis zum anderen Tage kalt stehen gelassen.

Das ausgeschiedene und abfiltrierte Kreatininchlorzink wird einige Male mit 50%igem Alkohol gewaschen, dann aus ihm durch Kochen mit Wasser und ziemlich viel Bleihydroxyd ($Pb(OH)_2$) die Kreatininbase frei gemacht[3]). Nach dem Kochen leitet man einige Minuten Schwefelwasserstoff durch die Lösung, bis die ganze Fällung fast rein schwarz geworden ist. Durch diesen Kunstgriff erhält man nämlich ein leicht filtrierbares Gemisch; das klare Filtrat wird dann durch Schwefelwasserstoff vollständig von Blei befreit und abermals filtriert. Die so erhaltene wasserklare Lösung enthält ein Gemenge von Kreatinin und Kreatin. Um aus diesem Gemenge alles als Kreatinin zu erhalten, versetzt man die Lösung mit 20 bis 30 ccm 1/1 n-Schwefelsäure und erhitzt sie auf dem Wasserbade unter Rückfluß 3 bis 4 Stunden; nun gibt man die berechnete Menge titrierter Barytlösung hinzu, filtriert das gefällte Baryumsulfat nach 1/2 Stunde ab und dampft das Filtrat samt Waschwasser rasch über freier Flamme soweit ein, bis in der noch kochenden Flüssigkeit ein Teil des gelösten Kreatinins bereits ausfällt. Läßt man erkalten, so erstarrt die ganze Flüssigkeit zu einem Kristallbrei. Das

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 235 (1904).

[2]) Durch das Kaliumbikarbonat wird Kreatinin nicht zersetzt, wie dies durch die freien Alkalien der Fall ist.

[3]) Durch Kochen mit einem sehr großen Ueberschusse von Bleihydroxyd und mit viel Wasser wird Kreatinin zum Teil in Kreatin übergeführt und zwar in umso größeren Mengen, je länger gekocht wird.

ausgeschiedene Kreatinin wird abgesaugt, mit wenig Alkohol ausgewaschen und durch zweimaliges Umkristallisieren aus wenig heißem Wasser rein erhalten.

2. Nach Maly[1]). Diese Methode beruht auf der Fällbarkeit des Kreatinins durch Quecksilberchlorid und Zerlegung des Niederschlags durch Schwefelwasserstoff, wodurch Kreatinin wieder frei wird.

Man dampft mehrere Liter Harn auf $^1/_3$ oder $^1/_4$ des ursprünglichen Volumens ein, gießt von den sich ausscheidenden Salzen ab, fällt mit Bleizuckerlösung vollständig aus, filtriert, entfernt aus dem Filtrate das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff und versetzt das hierbei erhaltene und mit Natriumkarbonat annähernd neutralisierte Filtrat mit einer gesättigten wässerigen Quecksilberchloridlösung. Der entstandene kreatininhaltige Niederschlag wird abfiltriert, unter Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Tierkohle entfärbt und die nach abermaligem Filtrieren aus demselben durch Eindampfen erhaltenen Salzmasse wiederholt aus absolutem Alkohol umkristallisiert; hierbei werden weiße Kristallkrusten oder große, glänzende Prismen von salzsaurem Kreatinin erhalten. Dieses wird schließlich mit Bleihydroxyd bei Gegenwart von Wasser zerlegt, wenn man reines Kreatinin darstellen will. Nach Stillingfleat und Johnson geht diese Zerlegung schon in der Kälte vor sich; man erhält dann fast reines Kreatinin und so gut wie kein Kreatin.

3. Nach Hofmeister[2]) fällt man das Kreatinin mit Phosphorwolframsäure aus. Man versetzt den Harn mit $^1/_{10}$ Vol. konz. Salzsäure, fällt mit Phosphorwolframsäure vollständig aus, läßt 1 bis 2 Tage stehen, wäscht den entstandenen Niederschlag durch Dekantieren mit verdünnter Schwefelsäure chlorfrei[3]), sammelt ihn auf einem Filter und preßt oder saugt ihn gut ab. Nun zerreibt man den Niederschlag, zur Bindung der Phosphorwolframsäure, mit Barytwasser zu einem dünnen Brei, erhitzt zum Kochen, setzt noch festen Aetzbaryt bis zur stark alkalischen Reaktion hinzu, filtriert ab, fällt aus dem Filtrate alles gelöste Baryum durch Einleiten von Kohlensäure und Aufkochen, und filtriert nochmals ab. Aus dem bei gelinder Wärme konzentrierten Filtrate fällt man das in der Lösung befindliche Kreatinin mit gesättigter Chlorzinklösung aus und zerlegt schließlich das auskristallisierte Kreatinin-Chlorzink nach den obigen Angaben mit Bleihydroxyd und Wasser.

Eigenschaften. Kreatinin kristallisiert in rhombischen Prismen, die in Wasser und Alkohol löslich, in Aether aber fast unlöslich sind. Kreatinin ist eine ziemlich starke, einsäurige Base, die mit 1 Aequivalent Säure meist gut kristallisierende, sauer reagierende Salze bildet. Das salzsaure Kreatinin $C_4H_7N_3O \cdot HCl$, beim Eindunsten der salzsauren Lösung des Kreatinins erhalten, ist in Wasser leicht löslich und kristallisiert in durchsichtigen Prismen und Tafeln. Das Chloroplatinat $(C_4H_7N_3O)_2H_2PtCl_6$ kristallisiert beim Mischen der alkoholischen Lösungen von salzsaurem Kreatinin und »Platinchlorid« in orangeroten Prismen und Nadeln aus, die in Wasser leicht, in Alkohol schwerer löslich sind. Das Chloroaurat $C_4H_7N_3O \cdot HAuCl_4$ kristallisiert in schön ausgebildeten, goldgelben Blättchen aus, wenn man die gesättigte wässerige Lösung von salzsaurem Kreatinin bei 40—50° mit einem kleinen Ueberschusse von Goldchlorid versetzt; es schmilzt wasserfrei bei 170—174°. Sehr schwer

[1]) Ann. d. Chem. 159, 279 (1871).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 67 (1881).

[3]) 5 Vol. konzentrierte Schwefelsäure auf 100 ccm Wasser.

lösliche Kreatininsalze sind das *pikrinsaure*, *phosphormolybdänsaure* und *phosphorwolframsaure Kreatinin*.

Pikrinsaures Kreatinin $C_4H_7N_3O \cdot C_6H_2(NO_2)_3(OH)$ scheidet sich beim Vermischen wässeriger Lösungen von Kreatinin und Pikrinsäure in langen, gelben, bei 212—213° schmelzenden Nadeln aus, die aus heißem Wasser unzersetzt umkristallisiert werden können. — *Pikrinsaures Kreatininkali*, $C_4H_7N_3O \cdot C_6H_2(NO_2)_3(OH) + C_6H_2(NO_2)_3(OK)$, kristallisiert aus einer Kreatininlösung auf Zusatz einer Pikrinsäurelösung aus, wenn gleichzeitig Kaliumsalze zugegen sind; es bildet lange, gelbe Nädelchen. — *Phosphormolybdänsäure* erzeugt in verdünnt salpetersauren Kreatininlösungen gelbe, kristallinische Niederschläge und *Phosphorwolframsäure* gibt mit mineralsauren Kreatininlösungen weiße, kristallinische Niederschläge. — Kreatinin gibt wie der Harnstoff mit verschiedenen *Schwermetallsalzen* schwer lösliche, zum Teil kristallisierende Verbindungen. *Quecksilberchlorid* fällt aus nicht zu verdünnten Kreatininlösungen feine Kristallnadeln. Versetzt man eine verdünnte Kreatininlösung zuerst mit Natriumacetat, dann mit Quecksilberchlorid, so scheiden sich nach einiger Zeit glasglänzende, wasserklare Kugeln von der Zusammensetzung $[(4C_4H_7N_3O \cdot HCl \cdot HgO) \cdot 3HgCl_2]$ ab. *Mercurinitrat* fällt verdünnte Kreatininlösungen nicht aus; setzt man aber Natriumcarbonat bis gerade zur bleibenden Färbung hinzu, so kristallisiert Kreatininmercurinitrat $[2C_4H_7N_3O \cdot HgO \cdot Hg(NO_3)_2]$ in mikroskopischen Nadeln aus. — *Kreatinin-Silbernitrat* $C_4H_7N_3O \cdot AgNO_3$ kristallisiert auf Zusatz einer konzentrierten Silbernitratlösung zu einer Kreatininlösung in Nadeln aus. *Kreatinin-Chlorzink* $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$, ist eine für Kreatinin besonders charakteristische Verbindung; es scheidet sich beim Zutropfen einer *konzentrierten säurefreien* Chlorzinklösung zu einer nicht zu verdünnten Kreatininlösung als feinkörniger Niederschlag, oder bei stärkerer Verdünnung und langsamer Ausscheidung, in Form feiner Nadeln und Prismen aus.

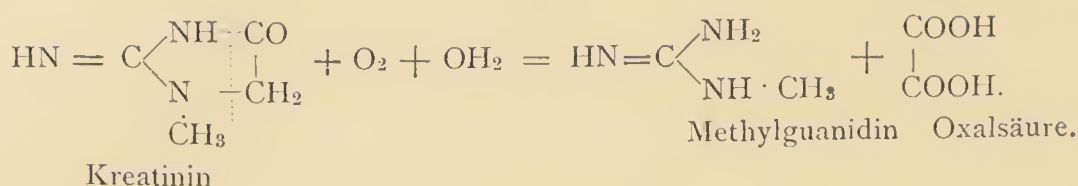
In *alkalischer* Lösung geht Kreatinin in Kreatin über; auch bei sehr langem Stehenlassen der wässerigen Lösungen oder rascher bei anhaltendem Kochen derselben vollzieht sich die gleiche Umwandlung.

Hydrolyse. Beim Kochen mit Barytwasser wird Kreatinin in *Methylhydantoin* und *Ammoniak* hydrolytisch gespalten:

$$\begin{array}{l} HN{=}C\langle {NH-CO \atop N(CH_3)-CH_2} \\ + (H_2O) \end{array} = NH_3 + O{=}C\langle {NH-CO \atop N(CH_3)-CH_2}$$

Kreatinin Methylhydantoin.

Oxydation. Quecksilberoxyd, übermangansaures Kalium sowie Bleisuperoxyd in Verbindung mit Schwefelsäure oxydieren Kreatinin zu *Oxalsäure* und *Methylguanidin*:



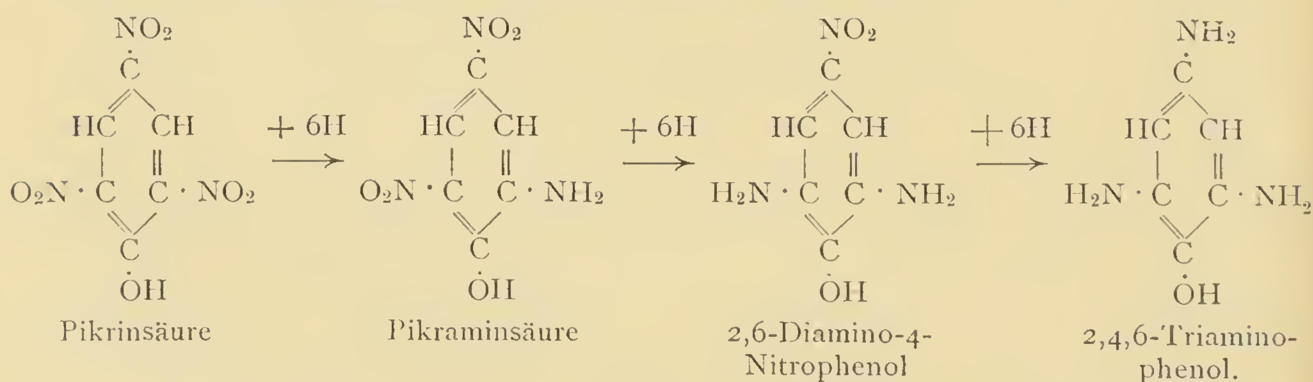
Eine alkalische Quecksilberoxydlösung wie die Knappsche Quecksilbercyanidlösung wird hierbei zu Quecksilber reduziert.

Fehlingsche Lösung wird bei anhaltendem Kochen mit Kreatinin entfärbt, also das Kupferoxyd derselben reduziert, ohne aber, daß eine Ausscheidung von Kupferoxydul erfolgt. Nur bei sehr langem Kochen des Kreatinins mit überschüssiger Fehlingscher Lösung wird wenig Kupferoxydul ausgefällt. Fäulnis. Gegen Fäulnis ist Kreatinin ziemlich beständig; im gefaulten Harne läßt es sich mit Hilfe der Weylschen Reaktion (s. unten) noch nach Wochen nachweisen.

Nachweis des Kreatinins im Harn.

1. Die Jaffésche Probe[1]). Versetzt man einige ccm Harn mit wenig wässeriger Pikrinsäurelösung und einigen Tropfen Natronlauge, so färbt sich das Gemisch durch das Kreatinin des Harns orangerot bis dunkelblutrot. Selbst bei einer Verdünnung von 1 : 5000 fällt die Probe noch positiv aus. Die Stärke der Färbung nimmt noch beim Stehen erheblich zu und erreicht etwa nach 5 Minuten ihr Maximum, aber schon nach etwa 1/2 Stunde geht die Färbung merklich zurück.

Die Jaffésche Probe beruht auf der Reduktion der Pikrinsäure durch das Kreatinin zu Pikraminsäure; aber auch Diaminonitrophenol und Triaminophenol entstehen hierbei:



Bemerkungen. Kreatin färbt sich mit einer alkalischen Pikrinsäurelösung selbst bei stärkeren Konzentrationen rein gelb, und erst bei längerem Stehen in der Kälte wird die Lösung rot. — Traubenzucker verhält sich in der Kälte gerade so wie Kreatin. — Aceton gibt eine schwach rötlichgelbe Färbung, welche mit der tiefroten Kreatininfärbung kaum verwechselt werden kann. Nur Acetessigsäure und Schwefelwasserstoff beeinflussen ebenfalls wie Kreatinin die Färbung der Natriumpikratlösung.

2. Die Weylsche Probe[2]). Versetzt man Harn erst mit einigen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 399 (1886).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 11, 2175 (1878).

Tropfen stark verdünnter, frisch bereiteter Nitroprussidnatriumlösung, dann tropfenweise mit verdünnter Natronlauge, so färbt sich das Gemisch durch den Kreatiningehalt des Harns schön rubinrot; die Färbung geht alsbald in Gelb über. Säuert man jetzt mit Essigsäure an und erhitzt, so färbt sich die Flüssigkeit erst grünlich, dann blau, und schließlich entsteht allmählich ein Niederschlag von Berlinerblau.

Bemerkungen. Kreatin gibt diese Probe nicht, wohl aber Aceton (Légalsche Probe); im letzteren Falle färbt sich aber die gelb gewordene Flüssigkeit beim Ansäuern mit Essigsäure bordeauxrot oder mehr violettrot. Zweckmäßigerweise kocht man vorhandenes Aceton vor dem Anstellen der Weylschen Probe weg.

3. Die Probe mit Fehlingscher Lösung nach Maschke[1]. Löst man in einer wässerigen Kreatininlösung Natriumcarbonat bis zur Sättigung und fügt »Fehling« hinzu, so entsteht bei Zimmertemperatur sehr allmählich, beim Erwärmen aber alsbald eine weißliche Trübung oder ein flockiger weißer Niederschlag, indem gleichzeitig die blaue Färbung der Lösung entsprechend abnimmt. Man erhält diesen weißen Niederschlag auch dann, wenn man die mit Kreatinin allein reduzierte Fehlingsche Lösung reichlich mit kalt gesättigter Sodalösung versetzt und abkühlt. Der so erhaltene weiße Niederschlag besteht aus Kreatinin-Kupferoxydul $(C_4H_7N_3O)_2 \cdot Cu_2O$, ist leicht löslich in Wasser und in Ammoniak, aber schwer löslich in gesättigter Natriumcarbonatlösung. — Kreatin gibt diese Probe in der Kälte nicht, wohl aber beim Kochen.

Die Kreatininproben von Jaffé, Weyl und Maschke gelingen nicht nur mit der freien Kreatininbase, sondern auch mit salzsaurem Kreatinin und mit Kreatinin-Chlorzink.

Die quantitativen Bestimmungen des Kreatinins im Harn.

1. Nach dem von Salkowski modifizierten Neubauerschen Verfahren[2].

Nach entsprechender Vorbereitung des Harns wird das Kreatinin als Kreatinin-Chlorzink ausgefällt und als solches gewogen.

Man versetzt in einem Meßcylinder 240 ccm Harn mit Kalkmilch bis zur schwach alkalischen Reaktion, fällt mit Chlorcalcium vollständig aus (Phosphorsäure, Oxalsäure etc.), füllt mit Wasser auf 300 ccm auf, schüttelt um, filtriert nach 1/4 Stunde durch ein trockenes Filter und dampft 250 ccm des Filtrats auf dem Wasserbade auf ca. 20 ccm ein. Diese durchrührt man mit ungefähr dem gleichen Volumen absolutem Alkohol, bringt dann das Gemisch ohne Verlust in ein 100 ccm Meßkölbchen, spült die Schale mit absolutem Alkohol nach, füllt das Kölbchen nach dem Erkalten mit absolutem Alkohol bis zur Marke auf und schüttelt tüchtig durch. Nun läßt man zur voll-

[1] Zeitschr. f. analytische Chemie 17, 134 (1878).

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 113 (1886).

ständigen Abscheidung des Chlornatriums bis zum nächsten Tage stehen, gießt alsdann durch ein trockenes Filter, versetzt 80 ccm des klaren Filtrats in einem Becherglase mit $^1/_2$—1 ccm alkoholischer Chlorzinklösung[1]), rührt längere Zeit tüchtig durch, wodurch die Abscheidung des Kreatininchlorzinkniederschlags außerordentlich beschleunigt wird und läßt, mit einer Glasplatte bedeckt, 2—3 Tage an an einem kühlen Orte, am besten in einem Eisschranke, ruhig stehen. Man bringt jetzt die ausgeschiedenen Kristalle in einen gewogenen Goochtiegel oder sammelt sie auf einem bei 100° getrockneten und gewogenen Filter, indem man zum vollständigen Ausspülen der Kristalle immer wieder das erhaltene Filtrat benutzt. Ist alles Kreatininchlorzink im Goochtiegel oder auf dem Filter, so wäscht man es noch so lange mit kleinen Mengen Weingeist nach, bis dieser farblos und chlorfrei abläuft[2]). Schließlich wird das Kreatininchlorzink bei 100° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die für die Bestimmung abgemessenen 80 ccm Filtrat, welche mit Chlorzink ausgefällt werden, enthalten das Kreatinin von $^4/_5$ des ursprünglichen Harnvolumens, also von 192 ccm ursprünglichem Harn. Der gewogene Niederschlag wird als reines Kreatininchlorzink $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$ in Rechnung gesetzt. Man versäume nicht, das gewogene Kreatininchlorzink mikroskopisch zu untersuchen, da demselben häufig Kochsalzwürfel und Oktaëder beigemengt sind. Von einem stark verunreinigten Niederschlage bestimme man den Stickstoff nach Kjeldahl und berechne aus der verbrauchten Menge $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder Oxalsäure das Kreatinin, indem die Rechnung zu Grunde gelegt wird, daß 1000 ccm $^1/_5$ normaler Säure $^1/_5 \frac{C_4H_7N_3O}{3} = {^1/_5} \frac{113}{3} = 7{,}533$ g Kreatinin entsprechen.

2. Die kolorimetrische Bestimmung nach O. Folin[3]) mit Hilfe des Autenrieth-Koenigsbergerschen Kolorimeters[3]).

O. Folin hat die Jafféschen Kreatininprobe (s. oben) zu einer kolorimetrischen Bestimmungsmethode ausgearbeitet. Schon Jaffé hatte gefunden, daß außer Aceton kein anderer normaler Bestandteil des Menschenharns mit einer alkalischen Pikrinsäurelösung eine ähnliche Färbung gibt wie das Kreatinin. Nur die pathologischen Bestandteile Acetessigsäure und Schwefelwasserstoff kommen noch in Betracht. Alle drei Stoffe können aber, falls sie zugegen sind, durch Aufkochen des Harns leicht entfernt werden.

Erfordernisse. 1. 1,2 %ige wässerige Pikrinsäurelösung. 2. 10 %ige wässerige Natronlauge. 3. Reines Kreatinin. 4. Ein Kolorimeter. — Für diese Be-

[1]) Syrupdicke wässerige Chlorzinklösung wird mit Weingeist bis zum spez. Gew. von 1,20 verdünnt, alsdann wird abfiltriert.

[2]) Man vermeide ein allzu langes, unnützes Auswaschen mit Weingeist.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 222 (1904).

stimmungen kann das von W. Autenrieth und J. Koenigsberger konstruierte Kolorimeter[1]) empfohlen werden.

Eichung des Keils. Der Glaskeil des Kolorimeters wird mit der Vergleichslösung gefüllt, und zwar je nachdem das kleine oder große Modell des Kolorimeters benutzt wird, mit 1/3- oder 1/5 n-Kaliumdichromatlösung. Die erstere enthält $\frac{1}{3}\frac{K_2Cr_2O_7}{6}$ g $= \frac{1}{3}\frac{294{,}5}{6} = 16{,}36$ g, die letztere $\frac{1}{5}\frac{K_2Cr_2O_7}{6} = \frac{1}{5}\frac{294{,}5}{6} = 9{,}816$ reines Kaliumdichromat im Liter. — Für die Eichung der »Kreatininkeile« verwendet man eine 0,1 %ige wässerige Lösung von reinem Kreatinin, das vor dem Abwägen etwa 1/4 Stunde bei 110° ausgetrocknet wird. Man bringt diese sorgfältig hergestellte Kreatininlösung in eine Bürette und läßt wechselnde Mengen derselben jeweils in einen 1 Litermeßkolben fließen, fügt je 15 ccm der wässerigen Pikrinsäurelösung (1) sowie 5 ccm der 10%igen Natronlauge (2) hinzu, schüttelt um, läßt jeweils genau 5 Minuten stehen — nach dieser Zeit ist das Maximum der Färbung erreicht —, füllt dann mit Wasser bis zur Marke auf und schüttelt gut durch. Mit dieser vollkommen klaren, rotgelb oder mehr gelbrot gefärbten Mischung füllt man sofort die Küvette (Trog) des Kolorimeters, verschiebt nun den Keil des Kolorimeters bis zur Farbengleichheit mit der Flüssigkeit in der Küvette und liest den zugehörigen Skalenteil am Kolorimeter ab. Wie bei allen derartigen kolorimetrischen Bestimmungen nimmt man mehrere, nämlich 4—6, Ablesungen vor und legt der kolorimetrischen Bestimmung jeweils das arithmetrische Mittel dieser Ablesungen zu Grunde. Auf diese Weise wurden für 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 ccm der 0,1 %igen Kreatininlösung die zugehörigen Skalenteile am Kolorimeter ermittelt und 7 Punkte der weiter unten aufgenommenen »Kreatininkurve« gefunden.

	Skalenteil
3 ccm Lösung = 3 mg Kreatinin auf 1000 ccm verdünnt:	94
4 » » = 4 » » » » » :	84
5 » » = 5 » » » » » :	73
6 » » = 6 » » » » » :	62
7 » » = 7 » » » » » :	53
8 » » = 8 » » » » » :	42
9 » » = 9 » » » » » :	31.

Zur Konstruktion der Kreatininkurve werden die Kreatininmengen in Milligrammen, bezogen auf 1000 ccm der Kreatinin-Natriumpikratmischung, auf die horizontale Abscissenaxe und die entsprechenden, am Kolorimeter abgelesenen zugehörigen Skalenteile auf die vertikale Ordinatenaxe eines Koordinatensystems eingetragen[2]). Die Verbindungslinie der jeweiligen Schnittpunkte bil-

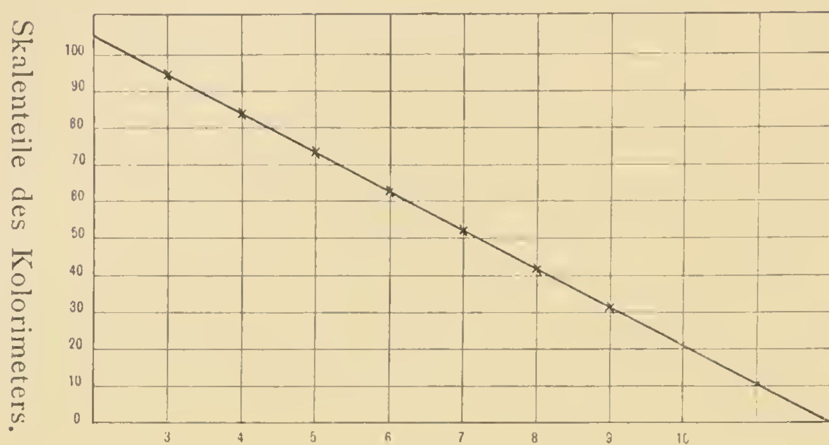
[1]) Münchener medizinische Wochenschrift 1910, Nr. 19 und ebenda 1911 Nr. 17.

[2]) Man verwendet hierzu Koordinatenpapier, das auch »Millimeterpapier« genannt wird.

det dann die Kreatininkurve, die nicht immer eine Gerade zu sein braucht.

Kreatininkurve.

Fig. 18.



mg Kreatinin in 1000 ccm Lösung oder in 5 ccm Harn.

Die Kreatininbestimmung im Harne führt man ganz analog aus wie die Eichung des Kreatininkeils. Man bringt 5 ccm des betreffenden Harns in einen 1-Liter-Meßkolben, fügt 15 ccm der Pikrinsäurelösung (1) sowie 5 ccm der Natronlauge (2) hinzu, läßt nach dem Umschütteln 5 Minuten stehen, füllt dann mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt tüchtig durch und füllt den Trog des Kolorimeters mit dieser Mischung, deren kolorimetrischer Wert durch Verschieben des Keils bis zur Farbengleichheit sofort zu ermitteln ist. Für den bei Farbengleichheit am Kolorimeter abgelesenen Skalenteil sucht man den zugehörigen Kreatininwert in der Kreatininkurve auf und findet so die Kreatininmenge in Milligrammen, die in 5 ccm des abgemessenen ursprünglichen Harns enthalten ist. — Von kreatininärmeren Harnen mißt man für eine jede Bestimmung 10 ccm Harn ab. Falls das Harn-Natriumpikratgemisch nicht vollkommen klar sein sollte — Trübung von Erdalkaliphosphat, Schleim —, gießt man es vor der kolorimetrischen Untersuchung durch ein Filterchen, da nur absolut klare Lösungen kolorimetrisch gut mit einander verglichen werden können; schon eine geringe Trübung stört die kolorimetrische Vergleichung außerordentlich.

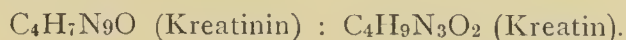
Bemerkungen. Fast in dem ganzen Bereiche des Kreatininkeils läßt sich auf Farbengleichheit gut einstellen; nur in dem Bereiche zwischen 75 und 95 besteht ein unwesentlicher Farbenunterschied, so daß dann photometrisch auf gleiche Helligkeit einzustellen ist, was meist keine Schwierigkeiten bereitet. Wie gering übrigens der Unterschied im Resultate der kolorimetrischen Bestimmung bei einer Differenz von einem Skalenteile ist, geht aus dem folgenden Befunde hervor. Bei einer Bestimmung wurde bei Skalenteil 57 Farbengleichheit erreicht, bei einer Kontrollbestimmung aber bei Skalenteil 58. Nach der obigen Kreatininkurve entspricht Skalenteil 57 6,5 mg Kreatinin in 5 ccm Harn, oder 1500 ccm des Harns haben 1,95 g Kreatinin enthalten, während für die Ablesung 58 die ent-

sprechenden Werte 6,4 mg und 1,92 g Kreatinin sind. Selbst wenn man die Farbengleichheit am Kolorimeter nur auf zwei Skalenteile genau ablesen sollte, ist die Differenz in den Kreatininwerten, welche diesen beiden verschiedenen Ablesungen entspricht, nur gering.

3. Die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtkreatinins des Harns = präformiertes Kreatinin plus Kreatinin, aus Kreatin entstanden.

Zur Ermittlung des Kreatingehaltes eines Harns bestimmt man zunächst in einer Probe nach den obigen Angaben das präformierte Kreatinin kolorimetrisch, dann in einer weiteren Probe das Gesamtkreatinin, indem man 20 ccm des ursprünglichen Harns mit 40 ccm $^1/_1$ n-Salzsäure 4 Stunden unter Rückfluß auf dem Wasserbade erhitzt; unter diesen Bedingungen wird das im Harn vorhandene Kreatin durch intramolekulare Abspaltung von 1 Mol. Wasser in Kreatinin übergeführt (s. oben). Das Harnsalzsäuregemisch ist nach dem Erhitzen stark dunkel gefärbt, eine Färbung, die infolge der folgenden sehr starken Verdünnung die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtkreatinins durchaus nicht stört. Das erkaltete Harnsalzsäuregemisch wird unter Anwendung der Tüpfelprobe mit blauem Lackmuspapier mit $^1/_1$ n-Alkalilauge neutralisiert, wozu in der Regel 38,5 bis 39 ccm der Lauge erforderlich sind, dann, unter Nachspülen des Kochkölbchens mit wenig Wasser, auf ein bestimmtes Volumen, 100 oder 120 ccm, verdünnt und gut gemischt. Hat man hierbei z. B. auf 100 ccm verdünnt, so bringt man 25 ccm des neutralisierten Gemisches = 5 ccm des ursprünglichen Harns, in einen 1 Litermeßkolben, fügt 15 ccm der Pikrinsäurelösung (1), sowie 5 ccm der Natronlauge (2) hinzu und verfährt im übrigen wie bei allen kolorimetrischen Kreatininbestimmungen. Zieht man von dem so gefundenen Gesamtkreatinin das präformierte Kreatinin ab, so erfährt man die Menge Kreatinin, welche aus dem Kreatin des Harns entstanden ist. Bei voraussichtlich kreatinreicheren Harnen mißt man für die Bestimmung des Gesamtkreatinins weniger ab als diejenige Menge ist, welche 5 ccm des ursprünglichen Harns entsprechen würde.

Beispiel. Ein Harn enthält in der Tagesmenge (1500 ccm) 1,95 g praeformiertes Kreatinin. — Nach 4stündigem Erhitzen dieses Harns mit $^1/_1$ n-Salzsäure zeigen 30 ccm (= 5 ccm Harn) des neutralisierten und auf 120 ccm verdünnten Gemisches nach der üblichen Behandlungsweise mit Natriumpikrat Farbengleichheit bei Skalenteil 47 = 7,5 mg Kreatinin in 5 ccm Harn; die Tagesmenge Harn hat somit 300 × 7,5 = 2,25 g Gesamtkreatinin enthalten. 2,25 — 1,95 = 0,3 g Kreatinin stammen demnach aus dem Kreatin des untersuchten Harns. Das so gefundene Kreatinin läßt sich nach der Proportion



$C_4H_7N_9O$ (Kreatinin) : $C_4H_9N_3O_2$ (Kreatin).

113 : 131 = 0,3 : x (x = 0,348)

auf Kreatin umrechnen. Die Tagesmenge Harn hat somit 0,348 g Kreatin enthalten.

Da der Quotient 131 : 113 = 1,1593 ist, erfährt man die dem Kreatinin entsprechende Menge Kreatin durch Multiplikation mit 1,1593.

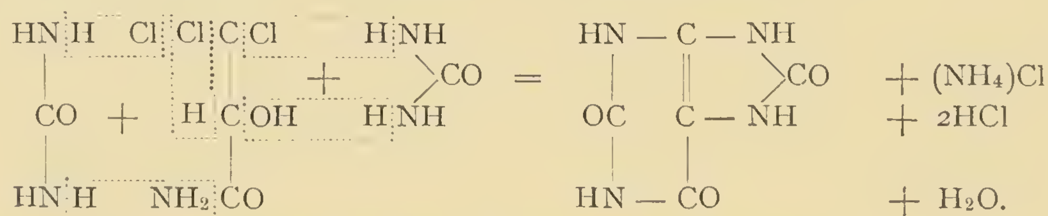
Harnsäure.

Harnsäure, 2, 6, 8-Trioxypurin, $C_5H_4N_4O_3$, findet sich im Harn des Menschen und der meisten Säugetiere regelmäßig, obwohl nur in geringer und sehr schwankender Menge vor. Im Harne der Vögel und Amphibien ist die Säure in solcher Menge vorhanden, daß sie den Hauptbestandteil der stickstoffhaltigen Substanzen des Harns dieser Tiere ausmacht. Blasensteine und Nierensteine bestehen häufig fast ausschließlich aus Harnsäure oder harnsaurem Salze.

Im Blute des gesunden Menschen kommt sie unter normalen Verhältnissen nicht oder höchstens in Spuren vor. Fast immer wird sie im Blute reichlicher gefunden bei Pneumonie (Lungenentzündung), Nephritis (Nierenentzündung), bei schwerer Anaemie, schweren Herzfehlern, sowie bei Gicht (Thierfelder)[1]. Bei letzterer Krankheit bildet sie oft Ablagerungen in den Gelenken, den Nieren, der Leber und anderen Organen. Unter normalen Verhältnissen findet sich Harnsäure beim Menschen in der Leber, sowie in Milz, Lunge, Pankreas, Gehirn nur in sehr geringer Menge vor.

Künstliche Harnsäure.

1. Nach J. Horbaczewski[2]. Harnsäure ist zuerst von Horbaczewski durch Zusammenschmelzen von Harnstoff mit Glykokoll, dann mit Trichlormilchsäure, besser mit Trichlormilchsäureamid künstlich dargestellt worden. Die Ausbeute an Harnsäure ist bei diesen Schmelzen keine gute, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, daß bei der hohen Temperatur, bei der die Reaktionen verlaufen, bereits gebildete Harnsäure wieder zersetzt wird:



Harnstoff + Trichlormilchsäureamid + Harnstoff = Harnsäure.

2. Nach Behrend und Roosen[3], welche aus Isodialursäure und Harnstoff Harnsäure erhielten. Als Ausgangsmaterial für die Darstellung der Isodialursäure diente der Acetessigester[4]. Harnstoff und Acetessigester verbinden sich unter Wasseraustritt zu β-Uramido-

---

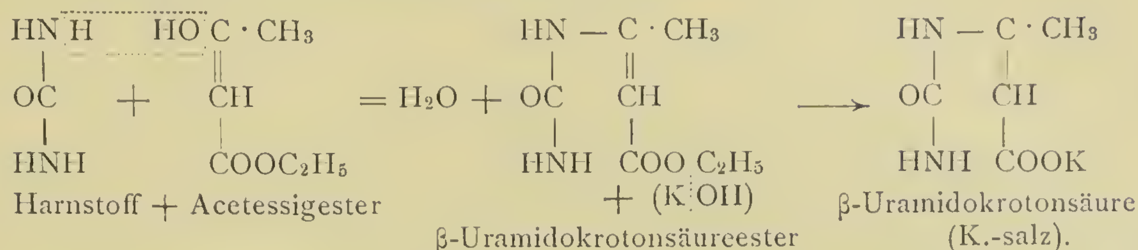
[1] Physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse, VIII. Auflage (1909).

[2] Monatshefte für Chemie **6**, 356 (1886) und **8**, 201, 584 (1888).

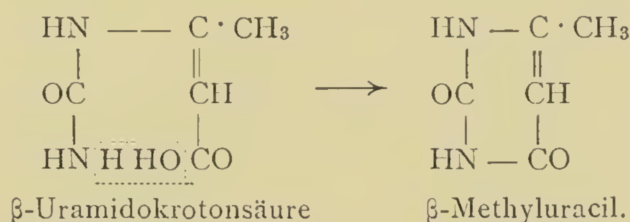
[3] Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **21**, 999 [1888] und Ann. d. Chem. **251**, 235 (1888).

[4] Der Acetessigester reagiert als tautomere Substanz, nämlich als β-Ketobuttersäureester (Ketoform) und als β-Oxykrotonsäureester (Enolform):

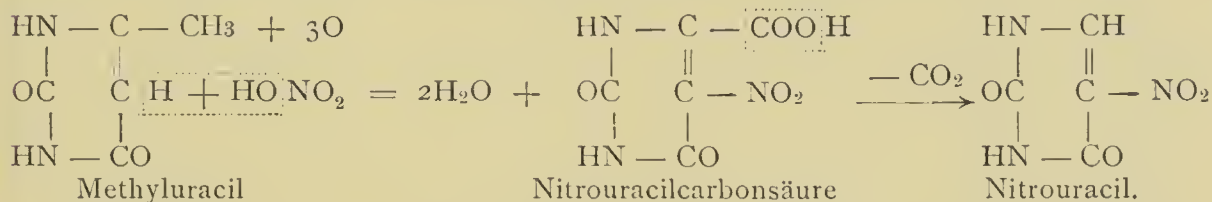
krotonsäureester, der durch Verseifung mit Kalilauge in das Kaliumsalz der β-Uramidokrotonsäure übergeht:



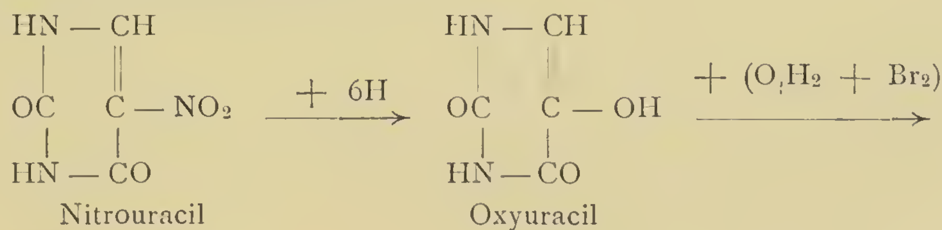
Wird die Säure aus ihrem Kaliumsalze frei gemacht, so geht sie unter Abspaltung von 1 Mol. Wasser in ihr inneres Anhydrid, das β-Methyluracil über:

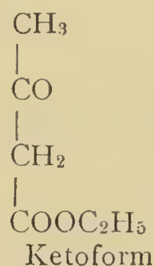


Auf β-Methyluracil wirkt rote rauchende Salpetersäure sowohl oxydierend wie nitrierend, indem die Methylgruppe zur Carboxylgruppe oxydiert wird und gleichzeitig eine Nitrogruppe eintritt; es entsteht zunächst die Nitrouracilcarbonsäure, die beim Kochen mit Wasser Kohlendioxyd abspaltet unter Bildung von Nitrouracil:



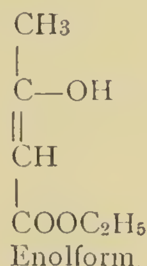
Nitrouracil, goldgelbe, in Wasser schwer lösliche Nadeln, wird durch Reduktion mit Zinn und Salzsäure, also durch naszierenden Wasserstoff, teils in Amidouracil, teils in Oxyuracil oder Isobarbitursäure übergeführt, welche durch Oxydation mit Brom plus Wasser fast quantitativ in Isodialursäure = Dioxyuracil umgewandelt wird. Diese stellt nun das letzte Zwischenprodukt bei der Synthese der Harnsäure dar, denn durch Kondensation mit einem Molekül Harnstoff liefert die Isodialursäure leicht Harnsäure:



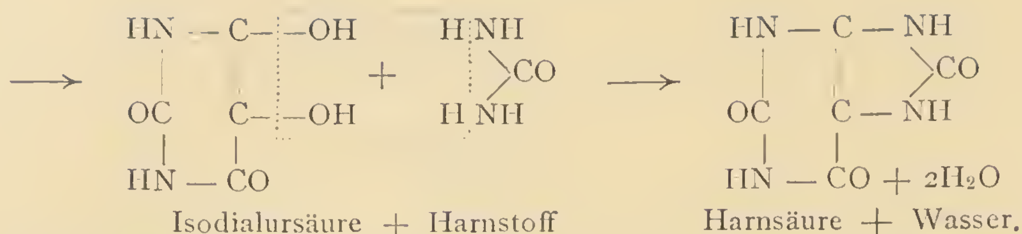


Ketoform

und



Enolform.

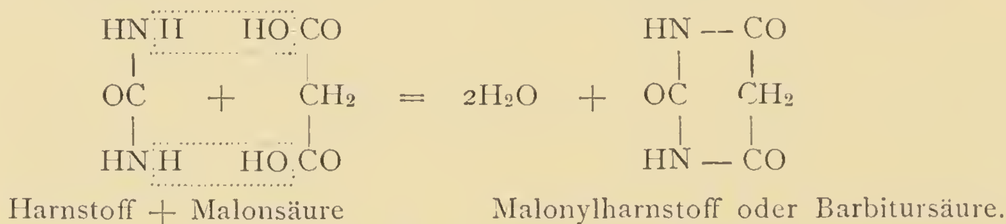


Isodialursäure + Harnstoff — Harnsäure + Wasser.

Zur Ausführung der letzten Reaktion wird die bei 100° von ihrem Kristallwasser befreite Isodialursäure mit der gleichen Menge Harnstoff und der sechsfachen Menge konz. Schwefelsäure etwa 5 Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt. Längeres Erhitzen vermindert die Ausbeute an Harnsäure. Die Reaktion geht innerhalb 24 Stunden auch bei gewöhnlicher Temperatur vor sich.

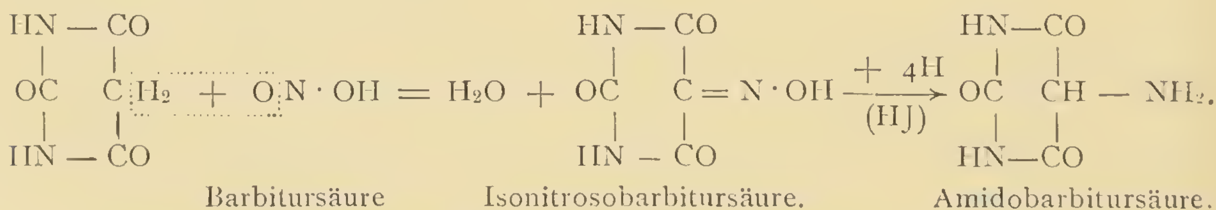
3. Nach Emil Fischer und Lorenz Ach[1]).

Als Ausgangsmaterial für diese Harnsäuresynthese dient die Malonsäure, welche beim Erhitzen mit Harnstoff und Phosphoroxychlorid[2]) auf 100° in Malonylharnstoff oder Barbitursäure übergeht:



Harnstoff + Malonsäure — Malonylharnstoff oder Barbitursäure.

Im Malonylharnstoff ist der Wasserstoff der Methylengruppe (CH_2-gruppe), in gleicher Weise wie im Malonsäureester beweglich und durch die Isonitrosogruppe (= N · OH) ersetzbar; dies gelingt mit Hilfe von salpetriger Säure, wobei die Isonitrosobarbitursäure oder Violursäure entsteht, so genannt, weil sie mit Metalloxyden violett und blau gefärbte Salze bildet; durch Reduktion mit Jodwasserstoffsäure wird die Isonitrosobarbitursäure zur Amidobarbitursäure oder dem Uramil reduziert:



Barbitursäure — Isonitrosobarbitursäure. — Amidobarbitursäure.

Amidobarbitursäure, eine aus Wasser in farblosen, glänzenden, an der Luft sich rot färbenden Nadeln kristallisierende Substanz, gibt beim Kochen mit einer konzentrierten Lösung von cyansaurem Kalium das Kaliumsalz der Pseudoharnsäure, aus dessen heißer, wässeriger Lösung Salzsäure die freie Pseudoharnsäure als weißes, aus kleinen Prismen bestehendes Pulver fällt:

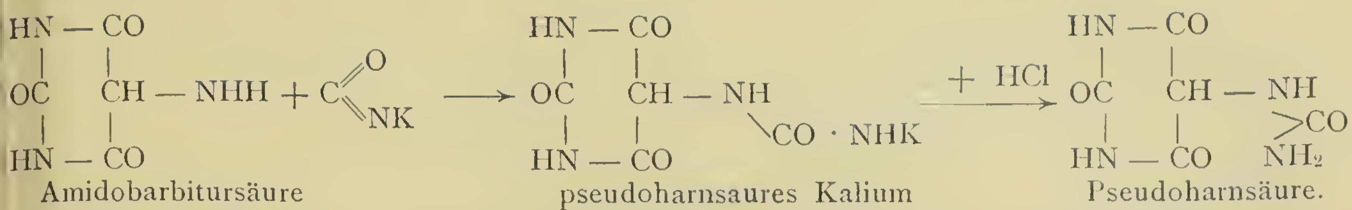
---

[1]) Berichte d. Deutsch. chem Ges. 28, 2473 (1895).

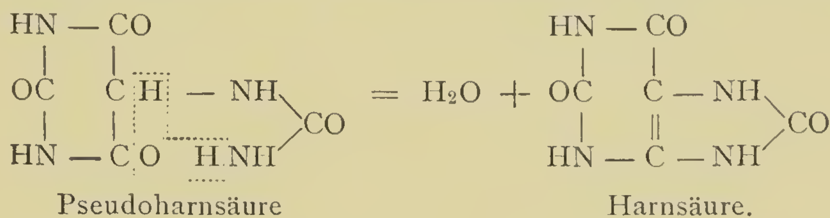
[2]) Phosphoroxychlorid dient hierbei als Kondensationsmittel, indem es schon mit kaltem Wasser äußerst lebhaft reagiert:



$$POCl_3 + 3(HOH) = PO_4H_3 + 3HCl.$$



Beim Erhitzen mit wasserfreier, schmelzender Oxalsäure auf 185^0 oder beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren geht die Pseudoharnsäure unter Verlust von 1 Mol. Wasser und unter Ringschluß in Harnsäure über. Mit Oxalsäure beträgt die Ausbeute 60 %; durch $^1/_4$stündiges Kochen von 1 Tl. Pseudoharnsäure mit 500 Tln. Salzsäure von 20% HCl sogar 80 % der angewandten Pseudoharnsäure (E. Fischer)[1]).



Natürliche Harnsäure.

1. Darstellung aus Harn. Man versetzt eine größere Menge, 1 bis 2 l Harn, der eiweißfrei sein muß, mit 30—40 ccm Salzsäure von 25 % HCl, um die Harnsäure aus den vorhandenen Uraten frei zu machen, läßt 2 Tage an einem kühlen Orte, zweckmäßig im Eisschranke, stehen, sammelt dann die ausgeschiedene, meist stark rotgelb oder rot gefärbten Harnsäurekristalle auf einem Filter und spült sie zuerst einige Male mit kaltem Wasser, dann noch mit Alkohol, aus, um den anhaftenden Farbstoff möglichst zu entfernen und etwa beigemengte Benzoë- und Hippursäure zu lösen. Nun bringt man die Kristalle auf dem Filter mit ziemlich stark verdünnter Natronlauge in Lösung, erwärmt die Lösung mit wenig Blutkohle, filtriert ab und fällt aus dem Filtrate mit Salzsäure die Harnsäure wieder aus.

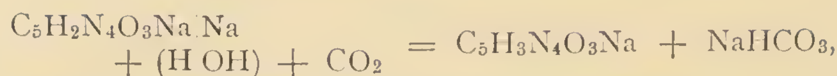
2. Darstellung aus Schlangenexkrementen. Man kocht die Schlangenexkremente mit 5 %iger Natronlauge aus, wobei ein allzu langes Kochen zu vermeiden ist, weil sonst Verluste an Harnsäure eintreten, filtriert ab und leitet in das Filtrat so lange Kohlensäure ein, bis es neutral oder kaum noch alkalisch reagiert. Hierbei fällt die Harnsäure als schwer lösliches saures harnsaures Natrium aus, das abfiltriert und durch Kochen mit verdünnter Salzsäure zerlegt wird. Beim Erkalten scheidet sich dann reine Harnsäure ab.

Man kann das zuerst erhaltene saure harnsaure Natrium auch nochmals in verdünnter Kalilauge lösen und die filtrierte Lösung in Salzsäure eingießen, wobei ebenfalls die Harnsäure gefällt wird.

Bemerkungen. Durch Kochen mit überschüssiger verdünnter Natronlauge wird die Harnsäure der Schlangenexkremente als neutrales Natriumurat $C_5H_2N_4O_3Na_2$ gelöst; aus dieser Lösung fällt Kohlensäure das schwer lösliche saure Natriumurat $C_5H_3N_4O_3Na$.

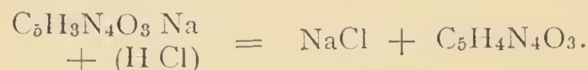
---

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 30, 560 (1897).



$$C_5H_2N_4O_3Na.Na + (H\,OH) + CO_2 = C_5H_3N_4O_3Na + NaHCO_3,$$

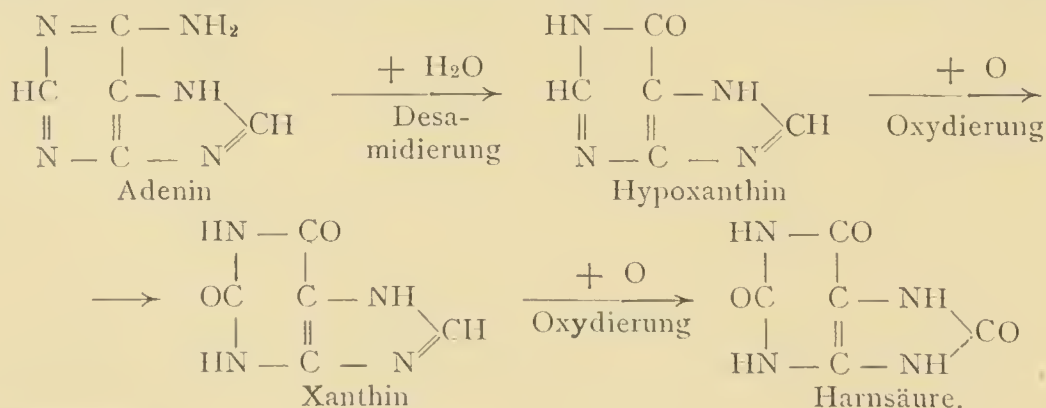
aus welchem schließlich Salzsäure die Harnsäure frei macht:



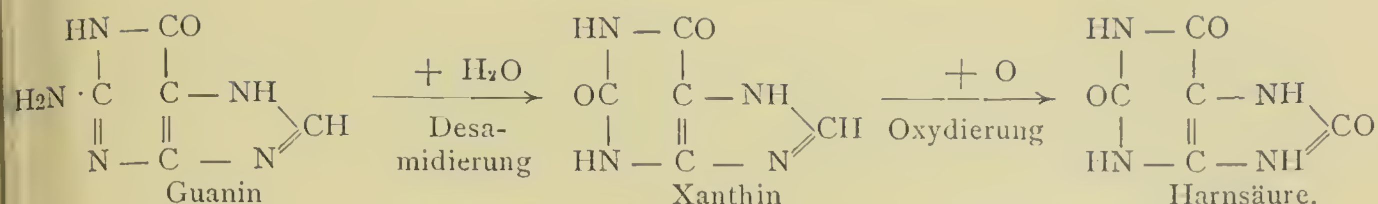
$$C_5H_3N_4O_3\,Na + (H\,Cl) = NaCl + C_5H_4N_4O_3.$$

Entstehung der Harnsäure im Tierkörper. Früher hatte man allgemein angenommen, daß Harnsäure eine der vielen Zwischenstufen zwischen Eiweißstoffen und Harnstoff sei, und daß im Organismus eine Umwandlung der Harnsäure in Harnstoff erfolge. Nach dieser Anschauung wäre die im Harne sich vorfindende Harnsäure nichts anderes als ein der Oxydation entgangener Anteil einer Harnstoffvorstufe. Nachdem Harnsäure aus nucleïnreicher Milz und aus Nucleïnen selbst durch oxydative Prozesse außerhalb des tierischen Organismus erhalten wurde (Horbaczewski) und ferner gezeigt wurde, daß nucleïnreiches Material, dem Tierkörper einverleibt, eine gesteigerte Harnsäureausscheidung bewirkt, war nachgewiesen, daß Harnsäure aus anderen Purinen, nämlich aus den Purinbasen der Nucleïne, hervorgehen kann, und daß somit diese Purine als die Quelle der im menschlichen Organismus gebildeten Harnsäure anzusehen sind. Die gegenwärtig herrschende Lehre dürfte, kurz gefaßt, dahin lauten, daß die Harnsäure aus den innerhalb des Körpers entstehenden = endogene Harnsäure und den mit der Nahrung zugeführten Purinen = exogene Harnsäure gebildet wird. Zu Gunsten dieser Anschauung sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen einer ganzen Reihe von Forschern.

Die Auszüge verschiedener Säugetierorgane wie diejenigen von Leber, Milz, Niere, Lunge, Muskel, Darm, besitzen die Fähigkeit, zugesetzte Purinbasen zu Harnsäure zu oxydieren (R. Burian, A. Schittenhelm)[1]. Hierbei wird das Adenin zuerst in Hypoxanthin umgewandelt und dieses in Xanthin übergeführt, das dann seinerseits zu Harnsäure oxydiert wird. Bei der Entstehung der Harnsäure aus den Aminopurinen Adenin und Guanin sind höchst wahrscheinlich zwei verschiedene Enzyme tätig, nämlich 1. ein hydrolytisch-desamidirend wirkendes Enzym, welches Adenin in Hypoxanthin und Guanin in Xanthin umsetzt und 2. ein oxydierend wirkendes Enzym, eine Oxydase, welche die nach 1. gebildeten Oxypurine Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure oxydiert:



[1]) Zeitsch. f. physiol. Chem. 43, 497 (1604/5) (Burian) und ebenda 42, 251 (1904), (Schittenhelm) 43, 228 (1901/5) 45, 121 (1905).



Die spezifische Oxydase, welche bei Körpertemperatur und Gegenwart von Sauerstoff Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure zu oxydieren vermag, hat R. Burian daher »Xanthinoxydase« genannt[1]). Die Desanidierungsfermente, welche die Aminopurine Adenin und Guanin in Hypoxanthin, bez. Xanthin verwandeln, nennt man »Adenase« und »Guanase«. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese beiden desmidierend wirkenden Enzyme identisch sind. A. Schittenhelm hat seine Versuche zunächst mit Milzextrakt angestellt und hierbei gefunden, daß Adenin und Guanin in Berührung mit demselben fast quantitativ in Harnsäure übergingen. Daß hierbei ausschließlich Fermente (Enzyme) eine Rolle spielen, bewies die Tatsache, daß die Versuche nicht gelangen, als an Stelle des frischen Milzextraktes Extrakte verwandt wurden, die einige Zeit auf 100°, also auf eine solche Temperatur gebracht worden waren, bei welcher fast alle Fermente ihre Wirksamkeit verlieren. Weiter hat Schittenhelm feststellen können, daß nicht nur die freien Aminopurine, sondern auch die an Thymusnucleïnsäure gebundenen in Harnsäure umgesetzt werden. Dieselbe Eigenschaft wie das Milzextrakt zeigte auch das Leberextrakt. — R. Burian hat die bemerkenswerte Tatsache aufgefunden, daß bei Digestion unter Sauerstoffabschluß sowohl in purinbasenarmen wie in purinbasenreichen Leberauszügen, ja selbst bei Zusatz von Purinbasen, eine merkliche Harnsäurebildung nicht stattfindet. Die zugesetzten Purinbasen wurden unter diesen Bedingungen unverändert und zwar quantitativ wieder gewonnen. Bei Digestion unter Sauerstoffzufuhr bilden purinbasenreiche Leberauszüge sehr erhebliche, purinbasenarme Auszüge hingegen kaum nennenswerte Harnsäuremengen. Fügt man aber diesen Leberauszügen Purinbasen zu, so ist unter den letzteren Umständen die Harnsäurebildung nicht nur bei den purinbasenreichen, sondern auch bei den purinbasenarmen Extrakten in hohem Grade gesteigert. Die Versuche von R. Burian haben somit ergeben, daß sowohl die Gegenwart von Sauerstoff wie auch die von Purinbasen unbedingt erforderlich ist, wenn die Bildung von Harnsäure in den Leberextrakten vor sich gehen soll.

Harnsäurezerstörung oder Urikolyse. Untersuchungen aus den letzten Jahren haben bestimmt ergeben, daß im tierischen Organismus nicht nur aus Purinbasen Harnsäure gebildet wird, sondern

[1]) Die Oxydase, welche die Oxypurine zu Harnsäure oxydiert, kann aus ihren Lösungen durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat gefällt werden. Schittenhelm erhielt aus derartigen Niederschlägen wirksame Extrakte, welche so gut wie keine Purinbasen und auch keine Nukleoproteide enthalten haben.

daß auch eine mehr oder weniger umfangreiche, nach der Tierspecies verschieden große Zerstörung der Harnsäure erfolgt, so daß nur ein Bruchteil der im Tierkörper gebildeten Harnsäure als solche ausgeschieden wird. Wie groß die Gesamtmenge der innerhalb einer bestimmten Zeit, beispielsweise von 24 Stunden, im Organismus gebildeten Harnsäure ist, läßt sich daher nicht angeben. Die Fähigkeit des Organismus, Harnsäure zu zerstören, ist beim Menschen zweifelsohne individuell verschieden groß. Die Harnsäurezerstörung scheint eine Funktion ganz bestimmter Organe zu sein. Ein solch urikolytisch wirkendes Ferment ist in der Niere, der Leber, dem Muskel des Rindes zu finden, während dagegen die Milz, Lunge und der Darm wohl Harnsäure zu bilden, aber nicht zu zerstören vermögen. Das Muskelextrakt vermag zugesetzte Purinbasen in Harnsäure umzuwandeln, und gleichzeitig kommt dem Muskel die Fähigkeit zu, Harnsäure zu zerstören. Dies hat R. Burian (l. c.) sowohl für den blutdurchströmten, überlebenden Muskel, wie auch für wässerigen Muskelauszug bestimmt nachgewiesen.

Nach den bisherigen Ausführungen steht also fest, daß die Purinbasen, welche im Tierkörper die endogene Harnsäure bilden, aus den Nucleoproteiden abgestorbener Körperzellen stammen, insbesondere aus den zu Grunde gegangenen Leukocyten herrühren können. Wenn also im Organismus infolge von Prozessen, bei welchen Zellen zerfallen, Purinbasen in Freiheit gesetzt werden, so werden die letzteren, höchst wahrscheinlich durch die im Tierkörper weit verbreiteten Enzyme Guanase (Adenase) und die Xanthinoxyden, in Harnsäure umgewandelt, ganz ebenso wie die von außen mit der Nahrung zugeführten Purinbasen. Anders verhält es sich mit der Frage, ob die Gesamtmenge der endogenen Harnsäure ausschließlich auf derartige Zerfallsprodukte von Körperzellen zurückzuführen ist? R. Burian verneint diese Annahme und ist der Ansicht, daß höchst wahrscheinlich nur ein sehr kleiner Teil der endogenen Harnsäure aus den Nukleoproteiden zerfallener Zellen speziell abgestorbener Leukocyten hervorgeht. Nach Burian existiert für die endogene Harnsäure noch eine andere, und zwar weitaus ergiebigere Quelle: »es sind dies die Purinbasen, welche im Stoffwechsel des lebenden Muskels kontinuierlich gebildet werden.«

Es liegt die Frage sehr nahe, ob im Organismus des Menschen und der Säugetiere eine Harnsäuresynthese vorkommen kann, also eine Entstehung von Harnsäure aus solchem Material, welches den Purinring noch nicht vorgebildet enthält? Nach dem heutigen Stande der Wissenschaft ist diese Frage im verneinenden Sinne zu beantworten.

Menge der ausgeschiedenen Harnsäure. Nach den obigen Ausführungen ist es selbstverständlich, daß die Menge der mit dem Harne ausgeschiedenen Harnsäure bedeutenden Schwankungen unterworfen ist; sie beträgt bei gemischter Kost durchschnittlich 0,6 bis 0,9 g Harnsäure, auf die 24-stündige Harnmenge bezogen. Auch

das Verhältnis der Harnsäure zum Harnstoff schwankt bedeutend, bei gemischter Kost im Mittel zwischen 1 : 50 und 1 : 70. Eine eiweißreiche Kost erhöht an und für sich nicht die Harnsäureausscheidung, sondern nur in dem Maße, wie sie Nukleoproteide und Nukleïne also Purinbasen bildende Gruppen enthält. So erklärt sich auch die Angabe, daß bei vegetabilischer Nahrung erheblich weniger Harnsäure ausgeschieden werde als bei reichlicher Fleischnahrung, bei welcher ihre Menge auf 2 g und mehr innerhalb 24 Stunden ansteigen kann. Bei Krankheiten, bei welchen ein reichlicherer Zerfall von kernhaltigen Zellen statt hat, sollte die Harnsäureausscheidung nach den gemachten Angaben stark gesteigert sein. Dies ist in der Tat der Fall bei Leukämie[1]) und wohl auch in vielen Fällen bei Pneumonie. Bei diesen Krankheiten kann nicht nur die absolute Menge der ausgeschiedenen Harnsäure stark vermehrt sein, sondern auch das Verhältnis der Harnsäure zum Harnstoff bez. Gesamtstickstoff ist stark verschoben und beträgt dann in vielen Fällen 1 : 9, gegen 1 : 50 bis 1 : 70 unter normalen Verhältnissen.

Eigenschaften. Die reine Harnsäure bildet ein weißes, kristallinisches Pulver, das bei mikroskopischer Untersuchung sehr kleine, rhombische Prismen oder Täfelchen erkennen läßt. Je unreiner die Harnsäure ist, umso schöner kristallisiert sie; so scheidet sie sich aus Harn beim Stehenlassen, freilich mehr oder weniger gefärbt, häufig in schön ausgebildeten rhombischen Tafeln oder Säulen aus, von welchen manchmal mehrere Kristalle mit einander verwachsen sind; die stumpfen Winkel dieser Kristalle sind meist stark abgerundet. Die Harnsäure ist in reinem Zustande geruch- und geschmacklos. — Harnsäure löst sich in reinem Wasser bei 18° im Verhältnisse von 1 : 39480. In einem Liter der gesättigten wässerigen Lösung sind demnach 0,0253 g Harnsäure gelöst. (W. His und Th. Paul)[2]) In Uebereinstimmung mit der Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Säuren ist die Löslichkeit der Harnsäure in $^1/_1$ n-Salzsäure oder Schwefelsäure geringer wie in reinem Wasser. Bei längerer Berührung mit Wasser zersetzt sich Harnsäure, vielleicht in Harnstoff und Dialursäure. Die Löslichkeitsgrenze wird schon in einer Stunde erreicht, wenn die fein verteilte Harnsäure mit Wasser geschüttelt wird. Harnsäure ist unlöslich in Alkohol und in Aether; sie wird aber leicht gelöst von den Alkalilaugen, sehr wenig von Ammoniakflüssigkeit, etwas leichter von einer wässerigen Lösung der organischen Base Piperazin[3]); in diesem Falle entsteht

[1]) Leukämie ist eine eigentümliche Krankheitsform, die der Hauptsache nach darin besteht, daß die Zahl der weißen Blutkörperchen stark vermehrt, andrerseits die absolute Zahl der roten Blutkörperchen entsprechend der Zunahme der weißen, stets vermindert ist. Enthält das normale Blut auf 350 rote 1 farbloses Blutkörperchen, so verändert sich dieses Verhältnis bei der Leukämie in 50 : 1 bis 10 : 1.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 1 und 64 (1900—1901).

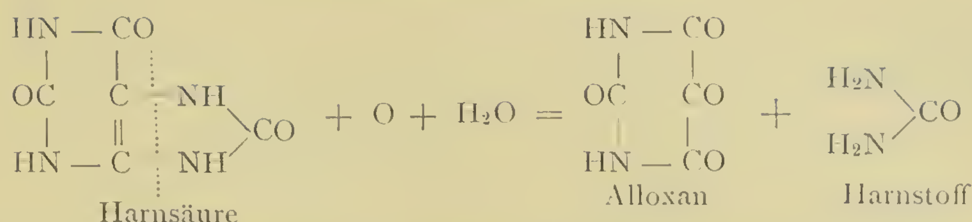
[3]) Piperazin = Diaethylendiamin = $HN\left\langle\begin{matrix}CH_2-CH_2\\CH_2-CH_2\end{matrix}\right\rangle NH$, ist eine starke zweisäurige, in Wasser lösliche Base.

neutrales harnsaures Piperazin $C_5H_4N_4O_3 \cdot HN(CH_2)_4NH$, das sich in 50 Tln. Wasser von 50° löst. — Harnsäure verhält sich wie eine zweibasische Säure und bildet als solche saure und neutrale Salze, von welchen besonders die sauren Alkaliurate in Wasser schwer löslich sind. Saures harnsaures Natrium oder saures Natriumurat $C_5H_2N_4O_3HNa$ findet sich häufig in Harnsedimenten und bildet meist den Hauptbestandteil des Ziegelmehlsediments (Sedimentum lateritium) sowie vieler Harnsteine. Als Sediment erscheint das Salz in amorphen Körnchen, und aus eingedampften Harnrückständen scheidet es sich in Kügelchen und Knollen aus. Es ist in 1100—1200 Tln. kaltem und in 125 Tln. kochendem Wasser löslich. Saures harnsaures Kalium oder saures Kaliumurat $C_5H_2N_4O_3HK$, bildet meist amorphe Körnchen, ist in 700 bis 800 Tln. kaltem und in 70 bis 80 Tln. siedendem Wasser löslich und findet sich wie das saure Natriumurat ebenfalls häufig in Harnsedimenten in Gestalt amorpher Körnchen vor. — Saures harnsaures Ammonium $C_5H_2N_4O_3H(NH_4)$ ist ebenfalls häufig ein Bestandteil von Harnsedimenten, manchmal auch von menschlichen Blasensteinen und Nierensteinen und bildet die Hauptmasse von Schlangen- und Vogelharn; es kristallisiert in mikroskopisch kleinen Nadeln, häufig in Kugel- und Stechapfelformen, ist in 1600 Tln. kaltem, viel leichter in siedendem Wasser löslich und fast unlöslich in einer gesättigten Ammoniumchloridlösung, eine Eigenschaft, welche man für die quantitative Abscheidung der Harnsäure als saures Ammoniumurat aus dem Harne verwertet hat. Ein neutrales harnsaures Ammonium läßt sich nicht darstellen.

Konzentrierte Schwefelsäure löst Harnsäure ohne Zersetzung; gießt man eine solche Lösung in viel Wasser, so fällt die Harnsäure unverändert wieder aus. Dieses Verhalten der Harnsäure kann man mit Vorteil dazu verwenden, um aus einer gefärbten Harnsäure, wie sie meist aus Harn gewonnen wird, ein farbloses Präparat herzustellen.

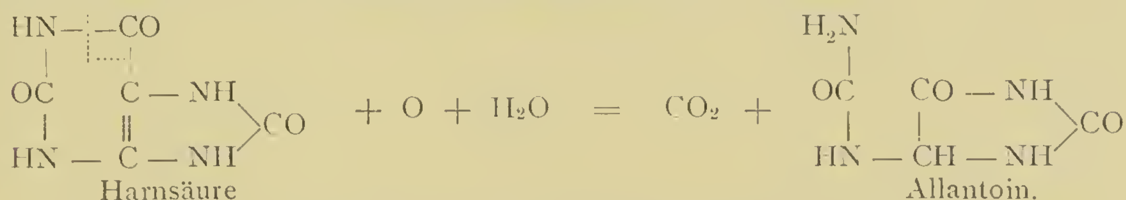
Harnsäure wirkt auf eine alkalische Kupferoxydlösung reduzierend, nicht aber auf eine alkalische Wismutlösung. Versetzt man eine Lösung von Harnsäure in verdünnter Natronlauge mit Kupfersulfatlösung, so bildet sich, besonders beim Erwärmen, ein weißer Niederschlag von harnsaurem Kupferoxydul; fügt man mehr Kupfersalz hinzu und kocht auf, so fällt Kupferoxydul aus. Ebenso erhält man harnsaures Kupferoxydul, wenn man eine Harnsäurelösung mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit ($NaHSO_3$) erwärmt; läßt man erkalten, so scheidet sich die Harnsäure als Kupferoxydulsalz, praktisch genommen, quantitativ aus.

Oxydation der Harnsäure. Harnsäure wird leicht oxydiert, und zwar verläuft die Oxydation in saurer und in alkalischer Lösung verschieden. Beispielsweise erhält man beim Sättigen von kalter, sehr starker Salpetersäure mit Harnsäure Harnstoff und Alloxan; der sechsgliedrige Pyrimidinring wird bei dieser Reaktion nicht aufgesprengt, wohl aber der fünfgliedrige Glyoxalinring:

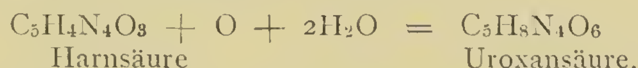


Wie die Salpetersäure wirken auch Chlor, Brom, sowie Braunstein in Verbindung mit Schwefelsäure, auf Harnsäure oxydierend ein.

Eine Zerlegung der Harnsäure in Allantoïn und Kohlendioxyd, wobei der sechsgliedrige Ring aufgespalten wird, erfolgt beim Kochen der Harnsäure mit Wasser und Bleisuperoxyd oder Braunstein, mit rotem Blutlaugensalz und Kalilauge, sowie beim Behandeln mit Ozon oder Kaliumpermanganatlösung; die gleiche Oxydation tritt ein, wenn Kupferoxydhydrat oder andere oxydierend wirkende Substanzen auf alkalische Lösungen der Harnsäure einwirken:



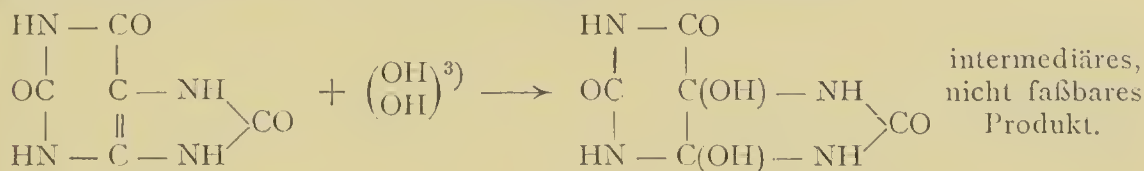
Neben Allantoïn entsteht als weiteres Produkt der Einwirkung von Kaliumpermanganat auf Harnsäure stets uroxansaures Kalium oder vielmehr ein Zwischenprodukt, welches beim Erwärmen mit viel Aetzkali in das Kaliumsalz der Uroxansäure übergeht. Uroxansäure wurde zuerst von Staedeler[1]) erhalten und zwar durch Stehenlassen einer alkalischen Harnsäurelösung an der Luft:



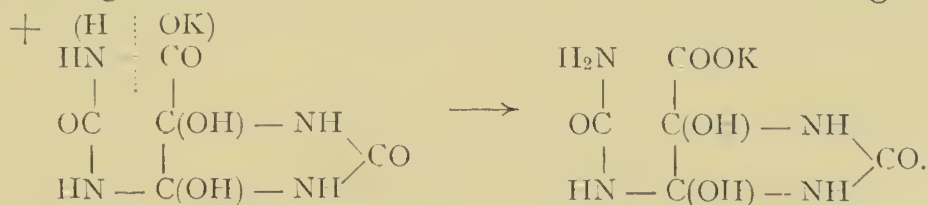
$$C_5H_4N_4O_3 + O + 2H_2O = C_5H_8N_4O_6$$

Harnsäure Uroxansäure.

E. Sundwik[2]) nimmt für die Bildung von Allantoïn und Uroxansäure ein gemeinschaftliches intermediäres Produkt an, das unter Aufhebung der Doppelbindung im Molekül der Harnsäure zu Stande kommen und bei der Behandlung mit Essigsäure in anderer Weise zerfallen soll als bei derjenigen mit Kalilauge.



a) Bildung von uroxansaurem Kalium mit Kalilauge:

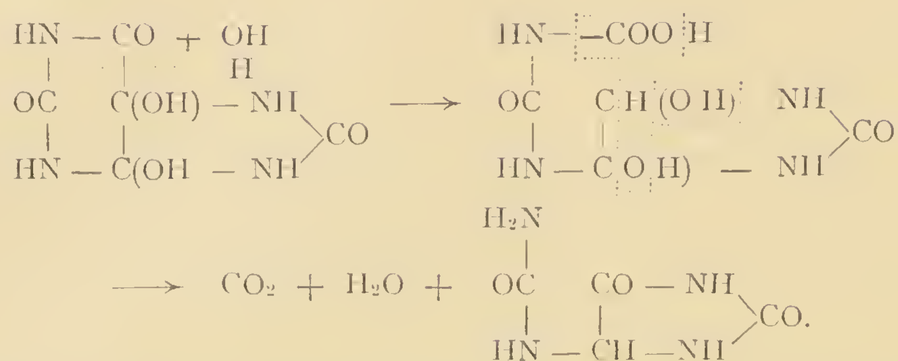


[1]) Ann. d. Chem. und Pharm. 78, 286 (1851).

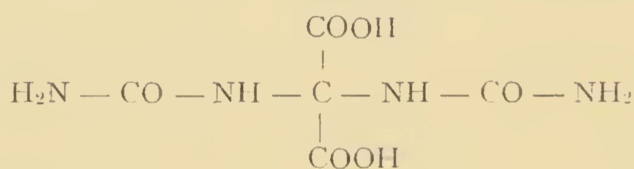
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 343 (1904).

[3]) $H_2O + O = \binom{OH}{OH}$.

b) Bildung von Allantoïn, Kohlendioxyd und Wasser mit Essigsäure:



Nach R. Behrend[1]) wäre die Uroxansäure eine starke zweibasische Säure, nämlich eine Diureïdomalonsäure von der folgenden Konstitution



Nachweis der Harnsäure im Harn.

Zu ihrem Nachweise muß die Harnsäure aus dem Harne erst nach dem obigen Verfahren abgeschieden werden. Die aus dem Harn erhaltenen, meist stark gefärbten Kristalle werden in der folgenden Weise als Harnsäurekristalle erkannt:

1. Mikroskopische Untersuchung. Die Kristalle sind gelb, gelbrot bis braunrot gefärbt und lassen die verschiedenartigsten Formen erkennen; die Wetzsteinform kommt besonders häufig vor; mehrere sich kreuzende Wetzsteine sind manchmal mit einander verwachsen. Diese Wetzsteinformen kommen in der Weise zustande, daß die stumpfen Winkel der ursprünglich rhombischen Tafel abgerundet werden. Außer den Wetzsteinformen kommen noch prismatische, zu Rosetten gruppierte Kristalle vor.

2. Die Murexidprobe. Man dampft in einem Porzellanschälchen einige der aus dem Harne erhaltenen Harnsäurekriställchen mit 3 bis 4 Tropfen konzentrierter Salpetersäure über einer ganz kleinen Flamme unter Daraufblasen vollständig zur Trockene ein, wobei man einen gelbroten bis roten Rückstand erhält, der sich nach dem Erkalten mit einem Tropfen Ammoniak purpurrot und mit wenig Natronlauge blau oder blauviolett färbt. Diese Färbungen verschwinden beim Erwärmen.

3. Die Kupfersulfatprobe. Man löst die aus dem Harne erhaltenen Harnsäurekriställchen in Natronlauge, fügt wenig Kupfersulfat hinzu und erwärmt nur gelinde; es scheidet sich weißes, harnsaures Kupferoxydul aus. Nimmt man mehr Kupfersulfat und kocht einige Zeit, so bildet sich ein roter Niederschlag von Kupferoxydul.

[1]) Ann. d. Chem. 333, 141 (1904).

Die quantitativen Bestimmungsmethoden der Harnsäure im Harn.

1. Nach Salkowski-Ludwig.

Während eine verdünntere Harnsäurelösung mit einer ammoniakalischen Silberlösung klar bleibt, entsteht sofort ein großflockiger oder gallertiger Niederschlag, wenn diesem Gemisch Magnesiamischung zugesetzt wird. Dieser Niederschlag besteht aus einem Silbermagnesiumurat von wechselnder Zusammensetzung. Auf diese Weise kann noch 1 mg Harnsäure aus 100 ccm Lösung ausgefällt werden. Durch Behandeln des Silbermagnesiumuratniederschlags mit Schwefelkalium oder Schwefelnatrium geht die Harnsäure als neutrales Alkaliurat in Lösung und scheidet sich beim Ansäuern der vom Schwefelsilber abfiltrierten Lösung mit Salzsäure und Eindampfen auf ein kleineres Volumen nahezu quantitativ in Kristallen aus. Diese werden auf gewogenem Filter oder in gewogenem Goochtiegel gesammelt, ausgewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen.

Durch die Magnesiamischung wird selbstverständlich auch die Phosphorsäure des Harns mit ausgefällt.

Erfordernisse. 1. Ammoniakalische Silbernitratlösung. Man versetzt die wässerige Lösung von 26 g Silbernitrat mit überschüssigem Ammoniak, so daß eine klare Lösung entsteht, und verdünnt diese mit Wasser zu 1 Liter. 2. Magnesiamischung. Man löst 100 g Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) und 200 g Chlorammonium zusammen in Wasser auf, fügt Ammoniak im bedeutenden Ueberschusse hinzu, so daß das Gemisch starken Ammoniakgeruch zeigt, und füllt schließlich mit Wasser zu 1 Liter auf. — 3. Schwefelkalium- oder Schwefelnatriumlösung. Man löst 1,5 g Aetzkali oder 1 g Aetznatron in 100 ccm Wasser und teilt die Lösung in zwei gleiche Teile; den einen Teil sättigt man mit Schwefelwasserstoff und fügt dann den zweiten Teil der Alkalilauge hinzu:



$$\alpha.\quad \begin{matrix} K\,OH \\ +\;SH\,H \end{matrix} = KSH + H_2O. \quad — \quad \beta.\quad \begin{matrix} KS\,H \\ +\;K\,OH \end{matrix} = K_2S + O_2H.$$

Das für die Herstellung der Schwefelalkalilösung verwandte Aetzkali oder Aetznatron muß frei sein von Salpetersäure und salpetriger Säure.

Ausführung. Vorbedingung für diese Bestimmung ist die Abwesenheit von Eiweiß in dem betreffenden Harne. Andernfalls muß der Harn zur Entfernung des vorhandenen Eiweißes nach Zusatz einiger Tropfen Essigsäure aufgekocht, nach dem Erkalten auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, dann abfiltriert werden.

Für jede Bestimmung mißt man 200 ccm Harn ab. Vorher mischt man sich je 20 ccm der ammoniakalischen Silbernitratlösung (1) und der Magnesiamischung (2) und fügt, falls hierbei ein Niederschlag von Chlorsilber entstehen sollte, noch Ammoniak bis zur Lösung des letzteren hinzu. Diese, nun vollkommen klare Mischung gießt man unter Umrühren oder Umschütteln zu dem Harn (200 ccm), der sich in einem Becherglase oder einem Erlenmeyerkolben befindet, läßt 1 Stunde ruhig stehen, bringt dann den entstandenen Niederschlag auf ein Saugfilter oder ein gewöhnliches Filter aus gut filtrierendem Papier, nachdem man sich davon

überzeugt hat, daß einige Tropfen eines klaren Silbermagnesiagemisches in einer Probe des erhaltenen Filtrats keinen Niederschlag mehr geben, und wäscht ihn, falls die Fällung vollständig ist, 2 bis 3 mal mit ammoniakhaltigem Wasser in der Weise aus, daß man gleichzeitig das Waschwasser zum Ausspülen des Becherglases benutzt; aus dem letzteren braucht aber keineswegs der letzte Rest des Niederschlags sorgsam auf das Filter gebracht werden. Man saugt den Niederschlag gut ab, so daß er sich, besonders wenn er rissig geworden ist, mit Hilfe eines Glasstabes vom Filter leicht ablösen und in das Becherglas, in welchem die Fällung ausgeführt wurde, zurückbringen läßt. — Nach dem von O. Folin angegebenen modifizierten Verfahren (s. unten) wird von dieser Stelle an in der unten angegebenen Weise gearbeitet. — Die am Filter noch haftenden Teilchen vom Niederschlage werden mittels einer Spritzflache möglichst vollständig in das Becherglas gespritzt, wobei man darauf achten muß, daß das Filter unversehrt bleibt. Nun werden 20 ccm der Schwefelalkalilösung (3) mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, zum Sieden erhitzt und auf das Filter gegossen; die abtropfende Flüssigkeit wird in dem Becherglase, in dem sich der Niederschlag befindet, gesammelt, das Filter mit wenig kochendem Wasser ausgespült und schließlich wird das Becherglas auf dem Wasserbade unter fleißigem Umrühren seines Inhaltes 3 Minuten lang erwärmt. Ein zu langes Erhitzen kann einen Verlust an Harnsäure herbeiführen. Nun gießt man den Inhalt des Becherglases durch das zuerst benutzte Filter in eine Porzellanschale — ein wiederholtes Zurückgießen, bis ein klares Filtrat erhalten wird, ist meist erforderlich —, säuert das Filtrat mit verdünnter Salzsäure schwach an, wozu in der Regel 3 bis 5 ccm einer 20%igen Salzsäure notwendig sind und dampft es dann auf dem Wasserbade auf 10 höchstens 15 ccm ein. Während des Eindampfens kristallisiert meist schon Harnsäure aus. Man fügt noch einige Tropfen Salzsäure hinzu, läßt in der Kälte, zweckmäßig in einem Eisschranke, 12 bis 20 Stunden stehen, sammelt die ausgeschiedene Harnsäure auf einem bei 110° getrockneten und gewogenen Filter oder Goochtiegel, wäscht erst mit wenig kaltem Wasser aus — Filtrat-Waschwasser sollen nicht mehr als 50—60 ccm betragen —, dann mit Alkohol, Aether und Schwefelkohlenstoff, um beigemengten Schwefel zu entfernen, sowie nochmals mit Aether und trocknet schließlich bei 110° bis zum konstanten Gewicht. Da die Harnsäure in Wasser nicht absolut unlöslich ist, müssen für je 10 ccm des erhaltenen wässerigen Filtrats zur gewogenen Harnsäure 0,00048 g zugezählt werden. Diese Korrektur ist nach Salkowski nur dann zulässig, wenn die Menge von Filtrat einschließlich des Waschwassers nicht mehr als 60 ccm beträgt.

Das von O. Folin und Phil. A. Shaffer modifizierte Verfahren[1].

Nachdem die Harnsäure aus dem Harne als Silbermagnesiaverbindung vollständig abgeschieden ist, wird das Silber nach der Salko-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32 552 (1901).

wski'schen Vorschrift in saurer Lösung mit Schwefelwasserstoff entfernt; dieses Verfahren leidet sehr an dem Uebelstande, daß das hierbei gefällte Schwefelsilber zum Teil kolloidal gelöst bleibt, wodurch ein wiederholtes Filtrieren nach vorausgegangenem Eindampfen notwendig wird; zudem läuft man Gefahr, mit dem Silbersulfid bereits auskristallisierte Harnsäure zu entfernen. Diese Schwierigkeit läßt sich nach Folin und Shaffer durch Zusatz von wenig Kupfersulfat beseitigen, indem man hierbei nach der folgenden Vorschrift arbeitet: Der ausgewaschene Silbermagnesiumuratniederschlag (s. oben) wird in ein Becherglas gespült, mit Wasser auf etwa 250 ccm verdünnt, 5 bis 10 ccm 1 %ige Kupfersulfatlösung sowie wenig Salzsäure zugefügt und durch die zum Kochen erhitzte Flüssigkeit Schwefelwasserstoff geleitet; das Kochen wird einige Minuten fortgesetzt, dann wird heiß abfiltriert und der Niederschlag mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat, das vollkommen klar sein muß, wird zunächst auf freiem Feuer, dann auf einem Wasserbade auf etwa 10 ccm eingedampft und, nach Zusatz einiger Tropfen Salzsäure, bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Im übrigen wird nach den obigen Angaben weiter gearbeitet.

Titrierung. Statt die Harnsäure zur Wägung zu bringen, kann sie auch mit $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung bei Gegenwart von Schwefelsäure titriert werden. Zu dem Zweck löst man die abgeschiedene Harnsäure in möglichst wenig Natronlauge, die aus Metall dargestelltem Aetznatron bereitet ist, verdünnt mit Wasser zu 100 ccm, fügt 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu und titriert die Lösung sofort mit der Permanganatlösung. S. weiter unten.

Bestimmung des Stickstoffs der Harnsäure nach Kjeldahl. Man kann auch die Harnsäure, statt sie zu wägen oder zu titrieren, mit dem Filter in einen Kjeldahlkolben bringen, 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure sowie ein erbsengroßes Stück Kupfervitriol hinzufügen und bis zum völligen Klarwerden des Gemisches kochen. Den nach Kjeldahl gefundenen Stickstoffwert hat man schließlich mit drei zu multiplizieren, um die entsprechende Menge an Harnsäure zu erfahren:

$$4N : C_5H_4N_4O_3 = 56 : 168 = 1 : 3.$$

2. Die Bestimmung nach Otto Folin und Phil. A. Shaffer[1]).

Dieses Verfahren beruht auf der Fällbarkeit der Harnsäure als harnsaures Ammonium durch Ammoniumsulfat und der Titration der im Niederschlage befindlichen Harnsäure mit $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganat bei Gegenwart von Schwefelsäure. Hopkins hat die Harnsäure aus dem Harne mit Chlorammonium ausgefällt, ein Verfahren, das aber den großen Nachteil hat, daß dann der Ammoniumuratniederschlag für die Titrierung erst mit Ammoniumsulfatlösung chlorfrei gewaschen werden muß, was recht zeitraubend ist. Folin-Shaffer haben ferner

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 224 (1898) und ebenda 32, 552 (1901).

gefunden, daß es viele pathologische wie auch anscheinend normale Harne gibt, welche eine Substanz enthalten, die wie Harnsäure schon durch geringe Mengen von Ammoniumsalzen gefällt wird und die Kaliumpermanganat reduziert. Allem Anscheine nach handelt es sich hierbei um eine Mukoidsubstanz, welche die Biuretprobe gibt und die auch in vollkommen klaren, filtrierten Harnen in kolloidaler Lösung vorhanden sein kann. Zur Entfernung dieser, die Harnsäuretitration störenden Substanz, erzeugen Folin und Shaffer mit Hilfe von Uranylacetat einen Niederschlag von Uranylphosphat $(UO_2)HPO_4$ oder Uranylammoniumphosphat $(UO_2)(NH_4)PO_4$, in welchen auch die mukoidartige Substanz des Harns übergeht.

Erfordernisse. 500 g Ammoniumsulfat, 5 g Uranylacetat und 60 ccm 10%ige Essigsäure werden in 650 ccm Wasser gelöst. Das Volumen der so erhaltenen Lösung beträgt fast genau 1 Liter.

Ausführung. Man mischt in einer Kochflasche 75 ccm der essigsauren Uranylacetat-Ammoniumsulfatlösung mit 300 ccm Harn, der höchstens Spuren von Eiweiß enthalten darf, und stellt das Gemisch zum Absetzen des Niederschlags 5 Minuten bei Seite. Dann wird durch zwei verschiedene Faltenfilter möglichst rasch abfiltriert; je 125 ccm der Filtrate (= je 100 ccm des ursprünglichen Harns) werden in zwei Bechergläser abgemessen, zu jeder Probe 5 ccm konzentriertes Ammoniak zugefügt, umgerührt und bis zum nächsten Tage bedeckt bei Seite gestellt. Nun bringt man die über den Niederschlägen stehenden Flüssigkeiten erst auf die Filter, spült die Niederschläge mit Hilfe von 10 % iger Ammoniumsulfatlösung auf die beiden Filter und wäscht noch einige Male mit derselben Lösung nach, d. h. so lange, bis im Waschwasser nur noch Spuren von Chlor nachgewiesen werden können. Solche Spuren von noch vorhandenen Chloriden stören die Titration der Harnsäure mittels Kaliumpermanganatlösung nicht. Das Filtrieren und Auswaschen der beiden Niederschläge beansprucht 20 bis höchstens 30 Minuten. Man nimmt nun die Filter aus ihren Trichtern, breitet sie auf einer Glasplatte aus, bringt die Niederschläge mit Hilfe von Spatel und Spritzflasche ohne Verlust in die Bechergläser zurück, in welchen die Fällungen ausgeführt werden, verdünnt eventuell noch mit Wasser, so daß das Ammoniumurat in etwa 100 ccm Wasser verteilt ist, fügt je 15 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure hinzu und titriert die hierdurch auf etwa 60^0 erwärmte schwefelsaure Lösung sofort mit $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung, indem man gegen Ende der Reaktion so lange je zwei Tropfen der Permanganatlösung zufließen läßt, bis beim Umschütteln die erste schwache Rotfärbung durch die ganze Flüssigkeit zu sehen ist. Auch wenn diese Rotfärbung nur ganz kurze Zeit hält, ist zu Ende titriert. Uebersieht man diesen Punkt, so titriert man über.

1 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung entspricht 0.00375 g = 3,75 mg Harnsäure. Wegen der, wenn auch geringen Löslichkeit des Ammoniumurates, die in der Harnflüssigkeit etwas größer als in reinem Wasser ist,

muß eine kleine Korrektur angebracht werden, indem man zu der, aus je 100 ccm Harn erhaltenen Harnsäuremenge 3 mg Harnsäure zuzuzählen hat.

Bemerkungen. Die Temperatur während der Titration kann zwischen 50 bis 70° schwanken, ohne daß das Resultat der Bestimmung irgendwie beeinflußt wird. Von 70° an verschwindet aber die rote Färbung, welche die Endreaktion anzeigt, zu rasch wieder und unterhalb 50° ist der Endpunkt nicht ganz so scharf.

Das Aequivalentgewicht des Kaliumpermanganats ist $\frac{2KMnO_4}{10}$ = Menge Kaliumpermanganat, die in schwefelsaurer Lösung $\frac{O}{2} = \frac{16}{2} = 8$ Gew. Tle. disponiblen Sauerstoff zu Oxydationszwecken liefert[1]). Diese Menge Sauerstoff (8) ist nämlich einem Atomgewicht Wasserstoff (= 1,008) gleichwertig.

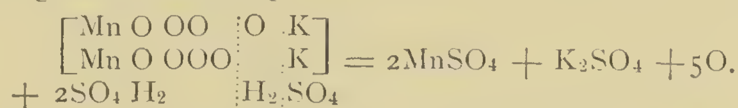
1000 ccm $^1/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung enthalten $^1/_{10}$ Grammaequivalent, also $^1/_{10}$ $\frac{2KMnO_4}{10}$ g, Kaliumpermanganat gelöst und

1000 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung enthalten demnach $^1/_{20}$ $\frac{2KMnO_4}{10}$ g Kaliumpermanganat gelöst = $^1/_{20}$ $\frac{2 \times 158,15}{10}$ = 1,5815 g $KMnO_4$.

Da der Titer der hergestellten Lösung doch erst bestimmt werden muß und das Kaliumpermanganat meist nicht chemisch rein ist, so löst man 1,6 g, mit einer Handwage abgewogenes Kaliumpermanganat in heißem Wasser und verdünnt die Lösung zu 1 Liter. Den Titer der so hergestellten Lösung bestimmt man am besten mit reiner kristallisierter Oxalsäure, deren Aequivalentgewicht $\frac{C_2H_2O_4 + 2H_2O}{2}$ ist. $^1/_{20}$ - Grammaequivalent Oxalsäure ist demnach $^1/_{20}$ $\frac{C_2H_2O_4 + 2H_2O}{2}$ = $^1/_{20}$ $\frac{126}{2}$ = 3,15 g kristallisierter Oxalsäure, eine Menge, die wieder 1,5815 g Kaliumpermanganat oder 1000 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung entspricht. — Um für die Titerstellung der hergestellten Kaliumpermanganatlösung keine allzu kleinen Oxalsäuremengen abwiegen zu müssen, von welchem schon ein kleiner Wägefehler einen größeren Fehler für die Titerstellung ausmachen würde, wiegt man 0,4—0,6 g der reinen kristallisierten Oxalsäure so genau wie möglich auf einer analytischen Wage ab, löst sie in einem Meßkölbchen in Wasser auf 100 ccm und verwendet für jede Titerstellung 10 ccm dieser Oxalsäurelösung. Man versetzt die abgemessenen 10 ccm Oxalsäurelösung reichlich mit verdünnter Schwefelsäure, erhitzt auf etwa 80° und läßt zu dieser heißeren Lösung die Kaliumpermanganatlösung aus einer Bürette bis zur schwachen Rotfärbung zufließen. Man wiederhole die Titerstellung mit der gleichen Menge (10 ccm) der Oxalsäurelösung. — Beispiel. Die hergestellte Oxalsäurelösung enthält 0,4895 g Oxalsäure in 100 ccm. Auf 10 ccm dieser

---

[1]) Die Titrationen mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung vollziehen sich nach der folgenden Gleichung:



$$\begin{bmatrix} Mn\,O\,OO & O\;K \\ Mn\,O\,OOO & K \end{bmatrix} = 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 5O.$$
$$+ 2SO_4H_2 \quad H_2SO_4$$

5 Atome Sauerstoff entsprechen aber 10 Aequivalenten Sauerstoff. Somit wird 1 Aequivalent Sauerstoff von $\frac{2MnO_4K}{10}$ geliefert.

Lösung (= 0,04895 g $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) werden bis zur Endreaktion 15,1 ccm der Kaliumpermanganatlösung verbraucht. Unter Bezugnahme auf die obigen Angaben erfordern diese 0,04895 g Oxalsäure nach der Proportion

g-Oxalsäure : ccm $^1/_{20}$ n-$KMnO_4$-lösung.

3,15 : 1000 = 0,04895 : x (x = 15,5)

15,5 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung, während bei dem Versuche nur 15,1 ccm von der hergestellten Lösung verbraucht wurden. Nach der Proportion

ccm hergestellte Lösung : ccm $^1/_{20}$ n-$KMnO_4$lsg.

15,1 : 15,5 = 1 : x (x = 1,02)

entspricht 1 ccm der hergestellten Lösung 1,02 ccm einer richtigen $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung = Faktor, mit welchem jeder, bei einer Titration verbrauchte ccm Lösung multipliziert werden muß, um die entsprechende Menge $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung in Erfahrung zu bringen.

Nach den Angaben von Folin und Shaffer oxydiert 1 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganatlösung 3,75 mg Harnsäure. Dieser Faktor ist empirisch gefunden, denn er entspricht nicht einer einfachen Oxydationsgleichung zwischen Harnsäure und Kaliumpermanganat; er ist also gerade so empirisch ermittelt, wie das Verhältnis des Traubenzuckers zum Kupferoxyd bei der Titration dieses Zuckers mit Fehlingscher Lösung. Der theoretische Wert von 4,2 mg Harnsäure für 1 ccm $^1/_{20}$ n-Kaliumpermanganat kann nach O. Folin nicht erreicht werden. Harnsäure wird, wie oben angegeben ist, entweder zu Alloxan + Harnstoff oder zu Allantoin + Kohlendioxyd oxydiert; in beiden Fällen kommt auf 1 Mol. Harnsäure 1 At. Sauerstoff.



$C_5H_4N_4O_3$ + O + OH_2 → $C_4H_2N_2O_4$ + $CO(NH_2)_2$.
Harnsäure — Alloxan — Harnstoff.
→ $C_4H_6O_3N_4$ + CO_2
Allantoin — Kohlendioxyd.

1000 ccm $^1/_{10}$ n-Kaliumpermanganatlösung, welche $^1/_{10}$ $\frac{O}{2}$ = 0,8 g Sauerstoff zur Oxydation abgeben, oxydieren demnach $^1/_{10}$ $\frac{C_5H_4N_4O_3}{2}$ = 8,4 g Harnsäure und 1000 ccm $^1/_{20}$ n-Permanganatlösung oxydieren daher 4,2 g der Säure; somit sollte 1 ccm $^1/_{20}$ n-$KMnO_4$-lsg. 0,0042 g = 4,2 mg Harnsäure entsprechen.

3. Die ursprüngliche Methode von Hopkins[1]).

Diese Methode beruht auf der, praktisch genommen, vollständigen Fällbarkeit der Harnsäure als Ammoniumurat beim Sättigen eines Harns mit Chlorammonium. Aus dem Niederschlage wird dann mit Salzsäure die Harnsäure frei gemacht und diese gewogen.

Ausführung. Man versetzt 200 ccm Harn mit 60 g Ammoniumchlorid, rührt um und läßt 2—3 Stunden kalt stehen. Dann sammelt man den Niederschlag auf einem gut filtrierenden Filter, spült ihn mit gesättigter Chlorammoniumlösung aus, spritzt ihn dann mit möglichst wenig heißem Wasser in ein Becherglas, zersetzt ihn unter gelindem Erwärmen mit verdünnter Salzsäure im geringen Ueberschusse und läßt bis zum anderen Tage in der Kälte, am besten in einem Eisschranke,

[1]) Journ. of Pathol. and Bacteriol. 1893 und Proceedings Royal Soc. Vol. 52.

stehen. Die auskristallisierte Harnsäure wird in einem bei 105—110° getrockneten Goochtiegel gesammelt, erst mit wenig kaltem Wasser, dann mit Alkohol und Aether ausgewaschen und schließlich bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Hopkins bringt noch eine Korrektur an, indem er zu der gewogenen Menge Harnsäure für je 15 ccm wässeriges Filtrat noch 1 mg zuzählen läßt.

Bemerkungen. Die Hopkins'sche Methode der Harnsäurebestimmung im Harn ist einfach in der Ausführung und gibt zudem recht befriedigende Resultate. Nur das Abfiltrieren und Auswaschen des Ammoniumuratniederschlags mit der gesättigten Chlorammoniumlösung beansprucht viel Zeit; bei zwei Versuchen mit dem gleichen Harne sind hierzu das eine Mal 1 Stunde 50 Minuten, das zweite Mal sogar zwei Stunden erforderlich gewesen.

Nach Kath. Kowalewski und S. Salaskin[1]) eignet sich die Methode von Hopkins' auch zur Bestimmung der Harnsäure im Blute. 100 ccm defibriniertes Blut werden in 500 ccm, in einer Porzellanschale zum Sieden erhitztes Wasser gebracht, zur vollständigen Koagulation der Eiweißstoffe wird die richtige Menge 10%ige Essigsäure zugefügt, die schwach saure Flüssigkeit noch einige Minuten zum Sieden erhitzt, kochend heiß abfiltriert und der Rückstand einige Male mit heißem Wasser ausgewaschen. Bei richtigen Arbeiten ist das Filtrat farblos und durchsichtig. Nun wird das gesamte Filtrat auf einem Wasserbade zur Trockne verdampft, der Rückstand mit kochendem Wasser wiederholt ausgelaugt und alsdann filtriert, wobei zur Beschleunigung der Filtration etwas Magnesiumsulfat und Natriumkarbonat hinzugefügt wird. Das Filtrat wird nun mit Ammoniumchlorid versetzt, der entstandene Niederschlag von Ammoniumurat nach 12 Stunden abfiltriert, unter Erwärmen auf dem Wasserbade durch Essigsäure zerlegt und daselbst auf ein kleineres Volumen eingeengt. Nach 12stündigem Stehen in der Kälte, zweckmäßig im Eisschranke, wird die abgeschiedene Harnsäure auf gewogenem Filter oder im gewogenen Goochtiegel abfiltriert, nach einander mit kaltem Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen und bei 105° getrocknet; zu der durch Wägung erhaltenen Harnsäuremenge werden schließlich für je 10 ccm wässeriges Filtrat 0,0005 g hinzugerechnet. — Es empfiehlt sich, das ausgefällte Ammoniumurat, vor der Zerlegung durch Essigsäure, erst in kochendem Wasser zu lösen und die heiße Lösung zur Entfernung von Beimengungen nochmals zu filtrieren.

4. Die Bestimmung nach Hopkins-E. Wörner[2]).

Nach der E. Wörner'schen Modifikation der Hopkins'schen Methode wird die Harnsäure aus dem Harne mittelst Chlorammonium als Ammoniumurat vollständig ausgefällt, das Ammoniak des Niederschlags durch Erwärmen mit 1%iger Natronlauge vollständig entfernt und der Stickstoff von der so erhaltenen Natriumuratlösung nach Kjeldahl bestimmt. Nach E. Fischer[3]) macht eine 1%ige Natronlauge aus Harnsäure kein Ammoniak frei.

Ausführung. Man erwärmt 150 ccm des betreffenden Harns in einem Becherglase auf dem Wasserbade auf 40—50°, löst 30 g Chlorammo-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 210 (1901).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 70 (1900).
[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 32, 435 (1899).

nium in dem Harn auf, nimmt nach 10 bis 15 Minuten das Becherglas vom Wasserbade und läßt es noch 1 Stunde kalt stehen. Dann sammelt man den entstandenen Ammoniumuratniederschlag auf einem kleineren Filter, wäscht ihn mit 10%iger Ammoniumsulfatlösung chlorfrei, löst ihn alsdann auf dem Filter in 20 bis 25 ccm heißer 1%iger Natronlauge auf — man nehme keine stärkere Lauge —, spült das Filter mit heißem Wasser aus und erhitzt das gesamte Filtrat in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade unter zeitweiligem Umrühren so lange, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist, bis also ein über die Lösung im Schälchen gehaltenes rotes Lackmuspapier nicht mehr gebläut wird. Nun spült man die Natriumuratlösung ohne Verlust in einen Kjeldahlkolben, fügt 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure, ein erbsengroßes Stück Kupfersulfat und, nachdem das Wasser verdampft ist, noch 5 g Kaliumsulfat hinzu und kocht bis zum völligen Klarwerden des Gemisches, was in der Regel in 15 bis 20 Minuten der Fall ist; dann kocht man zur vollständigen Oxydation noch weitere 10 Minuten. Schließlich wird das Ammoniak nach S. 161 abdestilliert, in 30 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder $^1/_5$ n-Oxalsäure aufgefangen und maßanalytisch bestimmt.

1000 ccm $^1/_1$ n-Schwefelsäure entsprechen $\frac{C_5H_4O_3N_4}{4} = \frac{168}{4} = 42$ g Harnsäure.

1000 ccm $^1/_5$ n- „ „ $\frac{C_5H_4O_3N_4}{4 \times 5} = \frac{168}{20} = 8{,}4$ g Harnsäure.

Somit entspricht 1 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder $^1/_5$ n-Oxalsäure 0,0084 g Harnsäure.

Bemerkungen. Beim Ausfällen der Harnsäure mit 20% Chlorammonium bei 40—45° erhält man einen kristallinischen, leicht filtrierbaren Ammoniumuratniederschlag, während bei der Fällung in der Kälte ein mehr oder weniger gallertiger, schwer filtrierbarer Niederschlag erhalten wird. Aber auch beim Arbeiten in der von E. Wörner angegebenen Weise beansprucht das Abfiltrieren und Auswaschen des Niederschlags mit 100 bis 130 ccm 10%iger Ammoniumsulfatlösung 1 bis $1^1/_2$ Stunden. Den ausgewaschenen Ammoniumuratniederschlag löst man in 20 bis 25 ccm 1 bis höchstens $1^1/_2$%iger heißer Natronlauge auf und spült dann das Filter 3 bis 4 Mal mit je 5 ccm heißem Wasser aus. Zum Verjagen des Ammoniaks aus dieser Lösung auf dem Wasserbade sind 25 bis 30 Minuten erforderlich. — Nach O. Folin und Phil. A. Shaffer[1]) sollen nach dem E. Wörnerschen Verfahren Spuren von Harnsäure im Harne gelöst bleiben, also nicht ausgefällt werden. Derartige Spuren dürften für praktische Zwecke ohne Bedeutung sein. — Man nehme zum Lösen des Ammoniumuratniederschlags auf jeden Fall keine stärkere als eine 1,5%ige Natronlauge, denn andernfalls könnten mehr als Spuren von Harnsäure unter Abgabe des Stickstoffs als Ammoniak zersetzt werden. In einem solchen Falle würde selbstverständlich zu wenig Harnsäure gefunden werden.

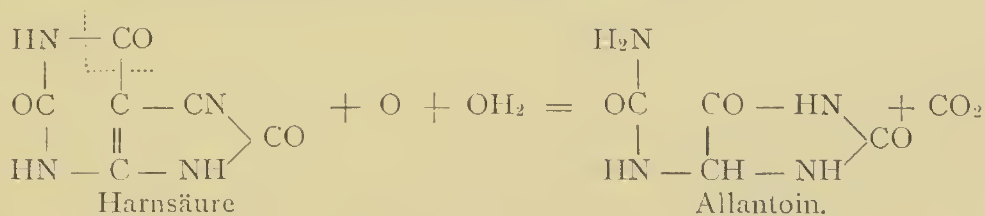
Allantoin

Allantoin oder Glyoxyldiureid $C_4H_6N_4O_3$ ist zuerst in der Allantoisflüssigkeit des Kalbes aufgefunden worden. Es findet sich ferner im Harn

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 552 (1901).

von Neugeborenen innerhalb der ersten 8 Tage nach der Geburt vor, ist aber auch ein normaler Bestandteil des Harns vom Erwachsenen, wenn Allantoin darin auch nur in sehr geringer Menge vorkommt. Es soll damit nicht gesagt sein, daß jeder Menschenharn Allantoin enthalten muß; reichlicher ist es vorhanden im Harn von Schwangeren (Gusserow und Hermann). Nach Untersuchungen von Wiechowski aus neuerer Zeit kommt Allantoin im Harn von Hunden, Kaninchen, Katzen und Affen vor. Gesteigert ist die Allantoinausscheidung im Hundeharn nach Einführung von Harnsäure oder Hypoxanthin, sowie nach Verfütterung von Kalbsthymus, Pankreas oder anderem nukleïnreichem Gewebe. Nach Untersuchungen von E. Salkowski[1]) wird beim Hund per os eingeführte Harnsäure zu einem wechselnden Bruchteil resorbiert, und zwar geht von der resorbierten Harnsäure ein erheblicher Teil in Allantoin, ein anderer Teil in Harnstoff über. Der Anteil der Harnsäure, welcher im Körper des Hundes in Allantoin übergehen kann, ist auf jeden Fall ein recht bedeutender, da in einem Falle nach Verfütterung von 8 g Harnsäure durch einfaches Eindampfen des Harns 1,45 g reines kristallisiertes Allantoin erhalten wurden (Salkowski). Auch bei bestimmten Vergiftungen wird beim Hunde reichlich Allantoin ausgeschieden. So hat dies Borissow[2]) zuerst bei Vergiftungen durch Hydrazin ($NH_2 \cdot NH_2$) gefunden; ebenso wirken Hydroxylamin ($NH_2 \cdot OH$), Semikarbazid $O = C(NH_2)(NH \cdot NH_2)$ und Aminoguanidin $HN : C(NH_2)(NH \cdot NH_2)$. Nach Vergiftung mit Hydrazin hat dann Pohl bei Hunden in der Leber und in Spuren auch in anderen Organen Allantoin nachgewiesen, während es in den Organen normaler Hunde nicht vorkommt. Das Hunden verfütterte Allantoin wird fast vollständig mit dem Harn wieder ausgeschieden, während beim Menschen allem Anscheine nach nur ein kleiner Teil zur Ausscheidung gelangt; der größte Teil dürfte verbrannt oder in Harnstoff übergeführt werden.

Darstellung aus Harnsäure. Allantoin wird verhältnismäßig leicht aus Harnsäure erhalten. Bei der Oxydation von Harnsäure mit Wasser und Bleisuperoxyd, mit Wasser und Braunstein, mit Ferricyankalium und Aetzkali, mit Ozon, Kaliumpermanganatlösung erhält man neben Kohlendioxyd stets Allantoin:



Harnsäure Allantoin.

Man trägt in, mit Wasser angerührte Harnsäure (161 Tle.) allmählich und unter Vermeidung von Erhitzung 110 Tle. Kaliumpermanganat ein, filtriert die Lösung, sobald sie farblos geworden ist, ab und säuert das Filtrat mit Essigsäure an. (Claus)[3]).

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 495 (1902).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 499 (1894).
[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 7, 227 (1874).

E. E. Sundwik[1]) gibt die folgende Vorschrift, nach der man Allantoin mit fast theoretischer Ausbeute erhält. Man verteilt 100 g Harnsäure in 2 Liter Wasser, bringt sie mit verdünnter Natronlauge in Lösung und fügt dann eine kalte konzentrierte Lösung von 62 g Kaliumpermanganat hinzu; es entfärbt sich das Oxydationsgemisch sehr bald, längstens nach etwa 1 Stunde. Man filtriert dann rasch ab, säuert mit Essigsäure an und dampft zur Kristallisation ein.

Darstellung aus Harn. Nach Loewy fällt man den schwach sauren Harn mit Merkuronitrat vollständig aus, filtriert den entstandenen Niederschlag ab, behandelt das Filtrat mit Schwefelwasserstoff, filtriert wiederum ab und fällt das hierbei erhaltene Filtrat, nach Entfernen des überschüssigen Schwefelwasserstoff durch Erwärmen, mit Magnesiumoxyd und Silbernitrat aus. Den abfiltrierten und ausgewaschenen Niederschlag zerlegt man unter warmem Wasser mit Schwefelwasserstoff und dampft das Filtrat zur Trockene ein; der Rückstand wird mit heißem Wasser ausgezogen und die erkaltete wässerige Lösung mit Mercurinitrat ausgefällt. Der hierbei entstandene Niederschlag, der alles Allantoin des Harns enthält, wird abfiltriert, ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem, auf ein kleineres Volumen eingedampfte Filtrat vom Schwefelquecksilber kristallisiert dann das Allantoin aus. Zu einer quantitativen Bestimmung des Allantoins im Harn eignet sich dieses Verfahren nicht.

Eigenschaften. Allantoin kristallisiert in glänzenden Prismen, ist in etwa 160 Tln. kaltem Wasser, aber viel leichter in heißem Wasser sowie in heißem Alkohol löslich; es ist fast unlöslich in kaltem absolutem Alkohol und in Aether. Beim Erhitzen bräunt es sich gegen 220^0 und schmilzt dann unter Zersetzung bei 231^0. Es verbindet sich mit Metallen, nicht aber mit Säuren. Durch ammoniakalisches Silbernitrat wird aus den konzentrierteren Lösungen des Allantoins flockiges Allantoinsilber $C_4H_5N_4O_3Ag$ gefällt, das in überschüssigem Ammoniak löslich ist. Auch durch Mercurinitrat wird Allantoin gefällt, wie auch durch eine mit Natriumacetat neutralisierte Lösung von Mercuriacetat. Bleiacetat, sowie Kupfersulfat und Natriumbisulfit fällen Allantoin nicht aus. Allantoin löst sich unverändert in Kalilauge; läßt man aber eine alkalische Lösung des Allantoins 2—3 Tage stehen, so enthält sie allantoinsaures Kalium:

```
H₂N  + (OK:H)
 |        :                              COOK
OC    CO  :  NH                            |
 |     |  :     >CO  =  H₂N · CO · NH — CH — NH · CO · NH₂.
HN — CH — NH
     Allantoin                  allantoinsaures Kalium.
```

Bei anhaltendem Kochen reduziert Allantoin die Fehling'sche Lösung. Im Unterschiede zur Harnsäure gibt Allantoin die Murexidprobe nicht. Durch Kochen mit Barytwasser liefert Allantoin Kohlensäure, Ammoniak, Hydantoin und Oxalsäure.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 343 (1904).

Zum Nachweis des Allantoins muß es zunächst aus dem Harne isoliert werden. Bei einigermaßen reichlichem Gehalt des Harns an Allantoin scheidet sich dieses aus, wenn man den Harn auf etwa den zehnten Teil seines Volumens eindampft und nach dem Ansäuern mit Essigsäure längere Zeit in der Kälte (Eisschrank) stehen läßt. Zu seiner Identifizierung gehört besonders das Verhalten gegen ammoniakalisches Silbernitrat und die Bildung von Oxalsäure bei 1 bis 2 Minuten langem Kochen der erhaltenen Kristalle mit 15 %iger Natronlauge; man versetzt dann mit Chlorcalcium und säuert mit Essigsäure an; bleibt hierbei ein weißer, kristallinischer Niederschlag ungelöst, so ist dadurch Oxalsäure und indirekt Allantoin nachgewiesen.

Quantitative Bestimmung des Allantoins im Harn nach W. Wiechowski [1].

Dieses Verfahren beruht auf der quantitativen Ausfällung des Allantoins durch Mercuriacetatlösung bei Zusatz von gesättigter 30%iger Natriumacetatlösung. Andere Substanzen des Harns, die unter diesen Bedingungen gleichfalls Niederschläge geben, wie Phosphorsäure, freies Ammoniak, Harnsäure, Purinbasen und fällungshemmende Stoffe wie freie Mineralsäuren und Ammoniumsalze werden durch vorausgehende Fällungen mit Phosphorwolframsäure, basischem Bleiacetat und Silberacetat entfernt, so daß keine Metalle, mit Ausnahme des Magnesiums und Natriums, vorhanden sind und alle Säuren durch Essigsäure ersetzt werden, die vor der Fällung mit dem Reagens schließlich durch Natronlauge neutralisiert wird. Man verwendet als Fällungsmittel eine 0,5 %ige, mit Natriumacetat versetzte Mercuriacetatlösung. Der ausgewaschene Allantoinquecksilberniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelquecksilber eingedampft; hierbei kristallisiert dann reines Allantoin aus. Wiechowski hat mit Hilfe dieser Methode durch verschiedene Tierversuche an Hunden, Kaninchen, Katzen und Affen festgestellt, daß das Allantoin ein konstantes Endprodukt des Säugetierstoffwechsels darstellt, während die Harnsäure, die gleichzeitig, aber in viel geringerer Menge ausgeschieden wird, als ein durch vorzeitige Abscheidung der Oxydation entgangenes Zwischenprodukt anzusehen ist. Verfütterung, sowie subkutane Injektion von harnsaurem Natrium bewirken bei Hunden und Kaninchen eine erhöhte Allantoinausscheidung, während nur ein kleiner Teil der zugeführten Harnsäure unverändert im Harn erscheint. Schon früher hatte Wiechowski nachgewiesen, daß Harnsäure durch überlebende Hundeleber und Rinderniere quantitativ zu Allantoin oxydiert wird.

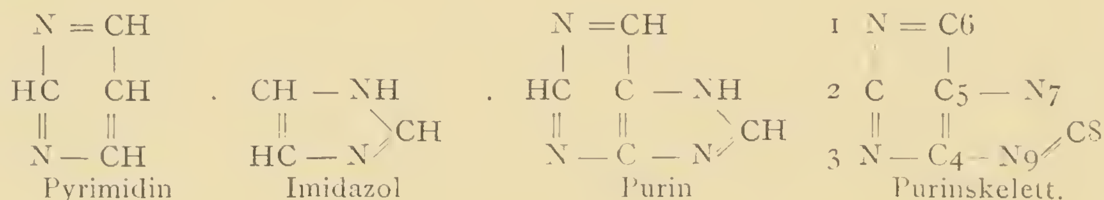
Nukleïnbasen oder Purinbasen.

Nukleoproteide sind im Tierkörper, hauptsächlich in den Zellkernen weit verbreitete Substanzen, und zwar sind sie zusammengesetzte oder ge-

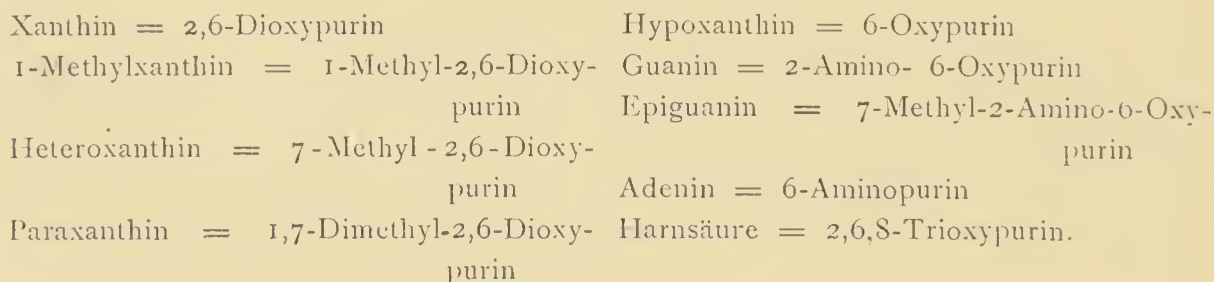
[1]) Beiträge z. chem. Physiol. und Path. 11, 109 (1908).

paarte Proteïne, welche als nächste Spaltungsprodukte Eiweiß und Nukleïnsäuren liefern. Die Nukleïnsäuren sind ziemlich reich an Phosphor und liefern als hydrolytische Spaltstücke Phosphorsäure, Purinbasen, auch Nukleïn- oder Alloxurbasen genannt, und ein Kohlehydrat oder ein Derivat eines Kohlehydrats. Die als Spaltstücke der Nukleïnsäuren vorkommenden Purinbasen sind Xanthin, Guanin, Hypoxanthin und Adenin. Einige liefern auch Pyrimidinbasen, nämlich Thymin, Zytosin und Urazil. — Als Kohlehydratgruppe hat man in der Guanylsäure und den pflanzlichen Nukleïnsäuren Pentose, in der Hefenukleïnsäure auch Hexose gefunden.

Alle im Tierkörper oder in dessen Exkreten aufgefundenen Alloxurbasen sind Abkömmlinge des von Emil Fischer synthetisch erhaltenen Purins, $C_5H_4N_4$. Alle aufgefundenen Tatsachen lassen sich unter Zugrundelegung der Annahme erklären, daß im Purin eine Kombination zweier heterocyklischer Ringsysteme vorliegt, nämlich eine solche des Pyrimidinringes mit dem Imidazolringe, wie folgende Formeln zeigen:

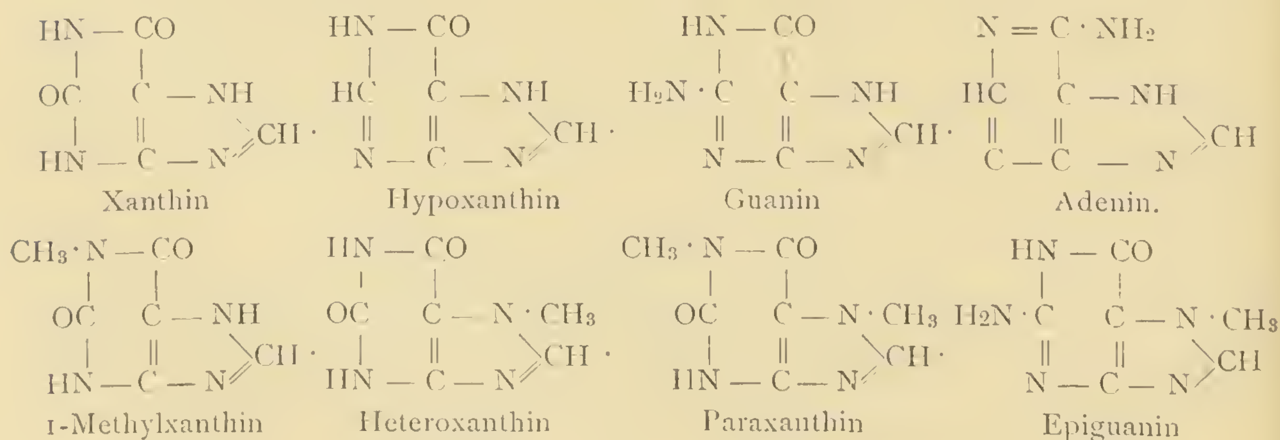


Dadurch, daß Wasserstoff des Purins durch Alkylgruppen, Hydroxyl oder die Amidgruppe ersetzt wird, entstehen Purinderivate, von welchen verschiedene sich im Tierkörper oder in dessen Exkreten vorfinden. Häufig gehen die Enolformen der Purinderivate in die Ketoformen über. Die physiologisch wichtigeren Purinderivate sind



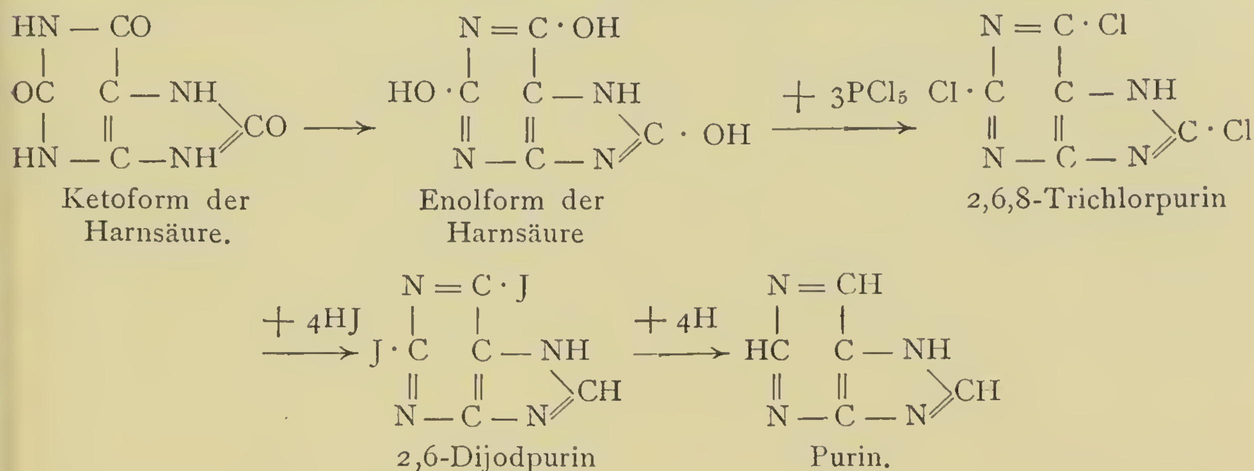
Xanthin = 2,6-Dioxypurin
1-Methylxanthin = 1-Methyl-2,6-Dioxypurin
Heteroxanthin = 7-Methyl-2,6-Dioxypurin
Paraxanthin = 1,7-Dimethyl-2,6-Dioxypurin
Hypoxanthin = 6-Oxypurin
Guanin = 2-Amino-6-Oxypurin
Epiguanin = 7-Methyl-2-Amino-6-Oxypurin
Adenin = 6-Aminopurin
Harnsäure = 2,6,8-Trioxypurin.

Konstitutionsformeln dieser Purinbasen:



Purin.

Das P u r i n, die Muttersubstanz aller Purinderivate, kann aus der H a r n s ä u r e dargestellt werden. Die Harnsäure geht mit Phosphorpentachlorid-Oxydchloridgemisch in 2,6,8-Trichlorpurin über. Man muß hierbei annehmen, daß die Harnsäure bei dieser Reaktion in der Enolform reagiert. Bei der Einwirkung von Jodwasserstoffsäure und Jodphosphonium bei 0^0 wird das 2,6,8-Trichlorpurin in 2,6-D i j o d p u r i n[1]) übergeführt, das beim Kochen seiner wässerigen Lösung mit Zinkstaub, also mit naszierendem Wasserstoff, zu P u r i n reduziert wird:



P u r i n kristallisiert aus Toluol in mikroskopisch kleinen Nädelchen, welche bei 211—212^0 schmelzen und sich bei stärkerem Erhitzen zum Teil unzersetzt verflüchtigen. Merkwürdigerweise ist Purin in Wasser sehr leicht löslich und zwar zu einer neutral reagierenden Lösung. Auch von warmem Alkohol wird es leicht gelöst, weniger leicht von Essigäther und Aceton, sehr schwer von Aether und Chloroform. Purin gibt sowohl mit Säuren wie mit Basen Salze, ist also gleichzeitig Base und Säure.

Purinbasen. Alle Purinbasen bilden mit Mineralsäuren kristallisierende Salze, die aber durch Wasser meist zerlegt werden. Aus saurer Lösung werden sie durch P h o s p h o r w o l f r a m s ä u r e gefällt. Ebenso scheiden sie sich aus und zwar als Silberverbindungen, wenn man ihre Lösungen in Ammoniak mit ammoniakalischem S i l b e r n i t r a t versetzt. Diese Silberniederschläge lösen sich in einer Salpetersäure vom spez. Gew. 1,1 in der Siedehitze auf und kristallisieren beim Erkalten aus. Ebenso werden die Purinbasen durch K u p f e r s u l f a t bei Gegenwart von N a t r i u m s u l f i t als Kupferoxydulverbindungen ausgefällt.

Außer Phosphorwolframsäure geben auch andere Alkaloidreagentien mit den Purinbasen Niederschläge, nämlich Phosphormolybdänsäure, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium, Quecksilberchlorid, ferner Bleiessig und Ammoniak, sowie Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung.

---

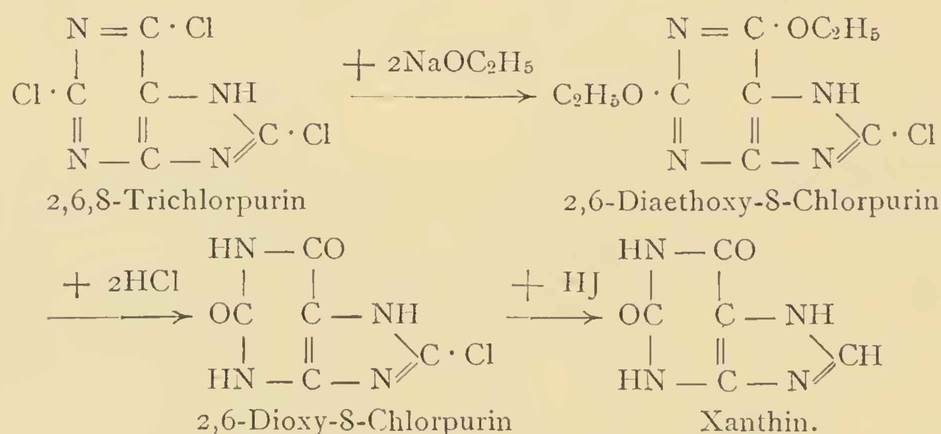
[1]) Da dieses D i j o d p u r i n bei der Hydrolyse, nämlich beim Erhitzen mit Salzsäure, in X a n t h i n oder 2,6-Dioxypurin übergeht, müssen sich die beiden Jodatome in der 2,6-Stellung befinden.

In den Geweben finden sich die Purinbasen meist nur in geringer Menge im freiem Zustande vor, in erheblich größerer Menge in Verbindung mit anderen Atomgruppen, hauptsächlich in Form der Nukleïnsäuren. Durch Behandlung der betreffenden Organe mit verdünnten Säuren in der Wärme werden Nukleïnbasen in größerer Menge frei.

Xanthin.

Xanthin, 2,6-Dioxpurin, $C_5H_4N_4O_2$, kommt im menschlichen Harn normaler Weise in Spuren vor. In seltenen Fällen hat man Xanthin in Harnsedimenten und Harnsteinen vorgefunden. Auch in den Faeces findet sich Xanthin vor. Man hat es ferner im Muskelfleisch, in der Milz, Leber, im Pankreas und im Gehirn nachgewiesen.

Synthese von E. Fischer[1]). Das aus Harnsäure erhältliche 2,6,8-Trichlorpurin (s. oben) geht beim Erhitzen mit überschüssigem Natriumäthylat C_2H_5ONa auf 100^0 in 2,6-Diaethoxy-8-chlorpurin über, das durch Kochen mit Salzsäure zu Alkohol und 2,6-Dioxy-8-chlorpurin verseift und letzteres durch Jodwasserstoff zu 2,6-Dioxypurin = Xanthin reduziert wird:



2,6,8-Trichlorpurin 2,6-Diaethoxy-8-Chlorpurin

2,6-Dioxy-8-Chlorpurin Xanthin.

Eigenschaften. Xanthin bildet ein farbloses, amorphes bis kristallinisches Pulver. Löst man Xanthin in wenig Alkalilauge, verdünnt die Lösung mit Wasser von ca. 60^0 so stark, daß auf 1 g Xanthin 2 l. Lösung kommen und säuert dann mit Essigsäure an, so kristallisiert das Xanthin bei langsamem Abkühlen und mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur in farblosen, glänzenden Drusen aus (J. Horbaczewski)[2]), die mikroskopisch aus glänzenden, rhombischen Blättchen bestehen und 1 Mol. Kristallwasser enthalten. In Wasser, auch siedendem, ist Xanthin nur wenig löslich, in Alkohol und in Aether ist es unlöslich. Von Alkalilaugen und Ammoniak wird es leicht, von verdünnten Säuren jedoch schwer gelöst. Die nicht zu verdünnte Lösung des Xanthins in Ammoniak gibt mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung einen flockigen, gallertigen Niederschlag, der in heißer Salpetersäure löslich ist; beim Erkalten scheidet sich Xanthin-Silbernitrat $C_5H_4N_4O_2 . AgNO_3$ in lichtbrechenden, kugligen Aggregaten kleiner Kristallnadeln aus. Wie die meisten Purinbasen wird auch Xanthin aus seinen

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 30, 2232 (1897).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 226 (1897).

Lösungen durch Bleiessig bei Gegenwart von Ammoniak wie auch durch Quecksilberchlorid gefällt.

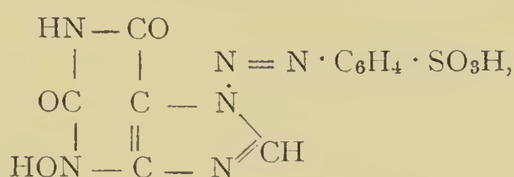
Nachweis des Xanthins.

1. Wird Xanthin in einem Porzellanschälchen mit starker Salpetersäure zur Trockne verdampft, so bleibt ein gelber Rückstand, der sich mit Natronlauge in der Kälte rot und beim darauffolgenden Erwärmen purpurrot färbt.

2. Weidelsche Probe, ausgeführt nach E. Fischer[1]). Kocht man in einem Reagensglase Xanthin mit starkem Chlorwasser oder mit Salzsäure und einer Spur chlorsaurem Kalium, verdampft dann im Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zur Trockne und setzt den Rückstand unter einer Glasglocke Ammoniakdämpfen aus, so färbt er sich alsbald rot oder purpurviolett.

3. Diazoreaktion von R. Burian[2]). Nach Burian geben nur diejenigen Purinderivate, in deren Imidazolring der Imidwasserstoff bei Stellung 7 nicht substituiert ist und bei denen die Amidinbindung unverändert erhalten ist, mit Diazokörpern intensiv gefärbte Reaktionsprodukte.

Zu diesen Purinbasen gehören Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Adenin. — Eine Lösung von Xanthin in Natronlauge färbt sich beim Zusatz von Diazobenzolsulfosäure tiefrot. Hierbei entsteht nach Burian 7-Diazobenzolsulfosäurexanthin



das beim Ansäuern mit Essigsäure gefällt wird und aus heißem Wasser in dunkelgelben, rosettenförmig angeordneten oder gekreuzten Nädelchen kristallisiert.

4. Bringt man zu Natronlauge, die sich in einem Porzellanschälchen befindet, wenig Chlorkalk, rührt um und trägt Xanthin ein, so bildet sich um die Xanthinkörnchen ein erst dunkelgrüner, bald aber sich braun färbender Hof, der dann wieder verschwindet.

Guanin.

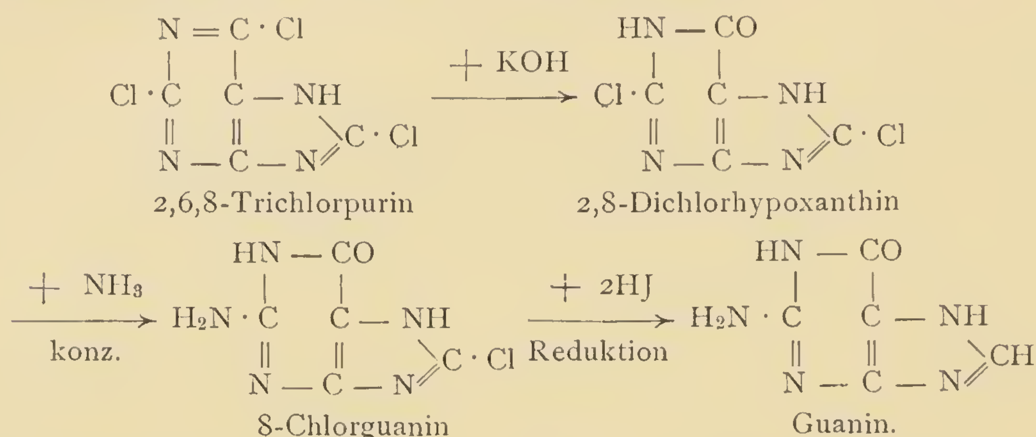
Guanin, 2-Amino-6-Oxypurin, $C_5H_5N_5O$, findet sich in fast allen Organen vor. Im Menschenharn ist es noch nicht sicher nachgewiesen. Unter pathologischen Verhältnissen wurde es im Blute, insbesondere im leukämischen Blute aufgefunden.

Synthese nach Emil Fischer. Das aus Harnsäure mit Phosphoroxychlorid-pentachlorid entstehende 2,6,8-Trichlorpurin

---

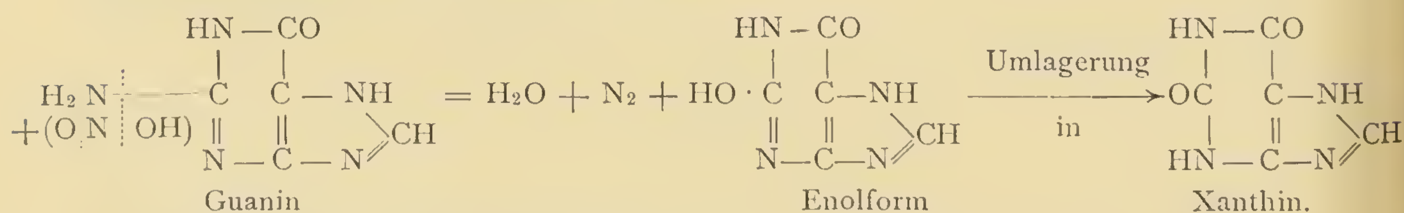
[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 30, 2236 (1897).
[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 37, 696 (1904).

(s. oben) tauscht beim Erhitzen mit Aetzkali auf 100⁰ das in Stellung 6 befindliche Chloratom gegen Hydroxyl aus, indem 2,8-Dichlorhypoxanthin entsteht. Die Konstitution des letzteren geht daraus hervor, daß es bei der Reduktion mit naszierendem Wasserstoff Hypoxanthin liefert. 2,8-Dichlorhypoxanthin geht beim Erhitzen mit konzentriertem alkoholischem Ammoniak auf 150⁰ in 8-Chlorguanin über, das durch Jodwasserstoff zu Guanin reduziert wird:



Eigenschaften. Guanin bildet ein weißes, meist amorphes Pulver, ist unlöslich in Wasser, Alkohol und Aether, leicht löslich in Alkalilaugen und in verdünnten Mineralsäuren. Horbaczewski hat Guanin in ähnlicher Weise kristallisiert erhalten wie das Xanthin. Vermischt man nämlich eine sehr verdünnte, etwa 60⁰ warme Lösung von Guanin in Natronlauge mit ca. $^1/_3$ Vol. Alkohol und säuert dann mit verdünnter Essigsäure an, so scheidet sich das Guanin in ziemlich großen, kristallwasserfreien Drusen aus. Guanin gibt mit Basen und Säuren Salze. Guaninsulfat $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + 2H_2O$, kristallisiert in langen Nadeln, die durch viel Wasser vollständig zerlegt werden. Metaphosphorsäure fällt Guanidin aus seinen Lösungen fast quantitativ aus.

Salpetrige Säure führt Guanin in Xanthin über, indem in normaler Weise die primäre Amidogruppe durch die Hydroxylgruppe ersetzt wird; die zunächst entstehende Enolform des Xanthins lagert sich hierbei alsbald in die Ketoform um:



Die gleiche Umwandlung des Guanins erfolgt bei der Fäulnis und durch ein im Körper in den Organen weit verbreitetes Desamidierungsferment.

Nachweis des Guanins.

1. Guanin gibt die Salpetersäureprobe des Xanthins; nur entsteht mit Natronlauge beim Erwärmen eine mehr blauviolette Färbung.

2. Guanin gibt die Diazoreaktion. S. Xanthin.

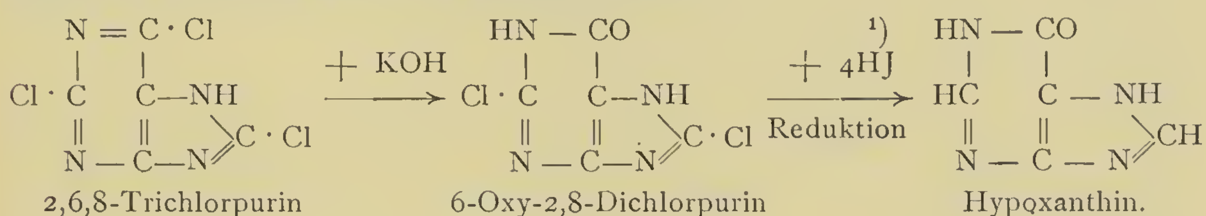
3. Eine warme Lösung von salzsaurem Guanin gibt mit einer kalt gesättigten Pikrinsäurelösung einen aus glänzenden Nadeln bestehenden, gelben Niederschlag.

4. Konzentrierte Ferricyankaliumlösung gibt selbst mit verdünnten Guaninsalzlösungen gelbbraune, in warmem Wasser lösliche Kristalle. Xanthin und Hypoxanthin geben keine Niederschläge.

Hypoxanthin.

Hypoxanthin, Sarkin, 6-Oxypurin, $C_5H_4N_4O$, ist in den Geweben weit verbreitet, findet sich aber normalerweise im Harn und in den Faeces nur in Spuren vor. Bei Leukämie ist Hypoxanthin im Blute und im Harn in bedeutenderer Menge gefunden worden.

Synthese (E. Fischer). Das aus der Harnsäure erhältliche 2,6,8-Trichlorpurin (s. oben) geht beim Erhitzen mit überschüssigem Aetzkali auf 100° in 6-Oxy-2,8-dichlorpurin über, welches durch Erwärmen mit konzentrierter Jodwasserstoffsäure und Phosphoniumjodid zu Hypoxanthin reduziert wird:

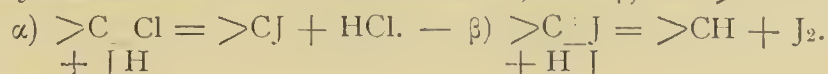


Hypoxanthin bildet farblose, sehr kleine Kristallnädelchen, ist in kaltem Wasser schwer, in kochendem Wasser leichter löslich, etwa 1 : 70, in Alkohol fast unlöslich. Wie alle Purinbasen gibt auch Hypoxanthin mit Säuren und mit Basen Salze. Es löst sich daher in sehr verdünnten Alkalilaugen, in Ammoniak und in verdünnten Mineralsäuren. Das salzsaure Hypoxanthin scheidet sich beim raschen Eindampfen in Kristallen aus. Hypoxanthinnitrat $C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O$, scheidet sich aus salpetersaurer Lösung in wetzsteinförmigen Kristallen aus. Hypoxanthinpikrat fällt aus Hypoxanthinlösungen bei Zusatz von Pikrinsäurelösung in gelben, glänzenden Tafeln aus. Bringt man eine kochend heiße Lösung von Hypoxanthinpikrat mit neutralem oder schwach saurem Silbernitrat zusammen, so wird das Hypoxanthin fast quantitativ als zitronengelbes Hypoxanthinsilberpikrat $C_5H_3N_4OAg \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$, gefällt. Ammoniakalisches Silbernitrat fällt aus siedend heißer Lösung Disilberhypoxanthin, das nach dem Trocknen bei 120° die konstante Zusammensetzung $C_5H_2N_4OAg_2 \cdot 1^1/_2\ H_2O$ hat. — Metaphosphorsäure fällt Hypoxanthin nicht.

Nachweis des Hypoxanthins.

Hypoxanthin gibt die Xanthinprobe mit Salpetersäure und

[1]) Der Jodwasserstoff wirkt hierbei nach α) und β) auf >C · Cl ein:

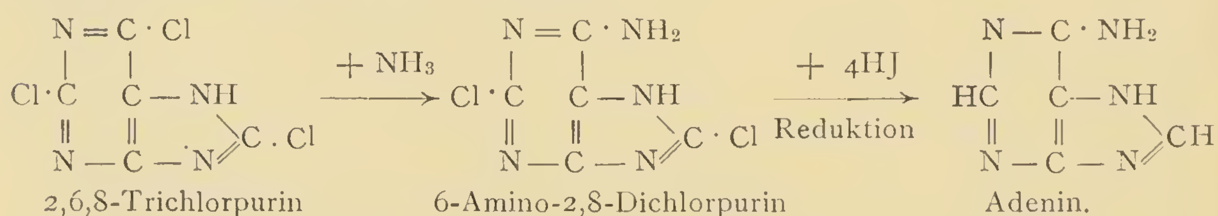


Natronlauge sowie die Weidelsche Probe nicht, wohl aber gibt es die Kosselsche Adeninprobe (s. Adenin), wenn auch die Farbenerscheinungen schwächer sind als beim Adenin, sowie die Diazoreaktion, also eine Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure. Ein allzugroßer Ueberschuß von Natronlauge muß beim Anstellen der Probe nach den letzten Angaben von Burian[1]) vermieden werden.

Adenin.

Adenin, 6-Aminopurin, $C_5H_5N_5 + 3H_2O$, wurde von Kossel entdeckt und zuerst aus dem Pankreas gewonnen. Es findet sich weit verbreitet in den Geweben des Tierkörpers. Im menschlichen Harne wurde es von Stadthagen und später von M. Krüger und G. Salomon[2]) bestimmt nachgewiesen. Es scheint im leukämischen Harne in größerer Menge vorhanden zu sein als in normalem Harne.

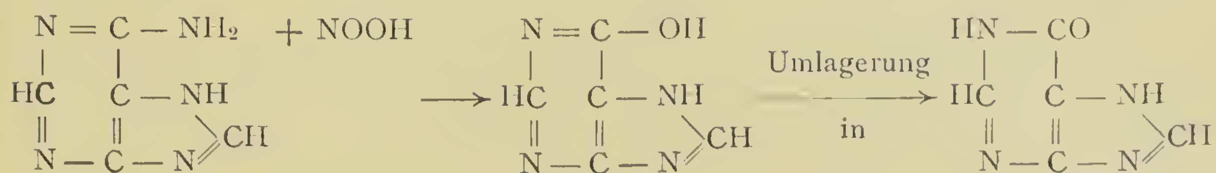
Synthese (E. Fischer). Durch Einwirkung von wässerigem Ammoniak auf das aus Harnsäure darstellbare 2,6,8-Trichlorpurin (s. oben) entsteht 6-Amino- 2,8-Dichlorpurin, welches beim Schütteln mit konzentrierter Jodwasserstoffsäure bei Gegenwart von Jodphosphonium in Adenin übergeht:



Eigenschaften. Adenin bildet lange, farblose Kristallnadeln, die 3 Mol. Kristallwasser enthalten und die beim Liegen an der Luft, rascher beim Erwärmen undurchsichtig werden. Erwärmt man die Kristalle mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Wasser, so werden sie beim 53^0 plötzlich trübe, eine Eigenschaft, die zum Nachweise des Adenins benutzt werden kann. Es löst sich in 1086 Teilen kaltem, viel leichter in heißem Wasser, ist etwas löslich in siedendem Alkohol, aber unlöslich in Aether. Wie alle Purinbasen löst sich auch Adenin in Säuren und in Alkalilaugen sowie in wässeriger Ammoniakflüssigkeit. Salzsaures, salpetersaures und schwefelsaures Adenin kristallisieren. Pikrinsäure fällt aus wässerigen Adeninlösungen das Pikrat, $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$, das aus heißem Wasser in dunkelgelben wasserfreien Prismen kristallisiert. Da die Löslichkeit des Pikrats in kaltem Wasser gering, nämlich 1 : 3500 ist, eignet sich dieses Salz zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Adenins. — Ammoniakalisches Silbernitrat fällt aus ammoniakalischen Adeninlösungen Niederschläge von der wechselnden Zusammensetzung $C_5H_4AgN_5$ und $C_5H_3Ag_2N_5$; löst man dieses Adeninsilber in heißer Salpetersäure, so bilden sich beim Erkalten Kristallnadeln von ebenfalls inkonstanter Zusammensetzung. —

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 423 (1907).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 364 (1898).

Durch salpetrige Säure wird Adenin in gleicher Weise in Hypoxanthin übergeführt wie das Guanin unter den gleichen Bedingungen in Xanthin:



Auch unter dem Einflusse von Fäulnisbakterien, besonders von Bakterium coli bei Luftabschluß, erfährt Adenin die gleiche Umwandlung in Hypoxanthin.

Nachweis des Adenins.

Adenin gibt die Xanthinprobe mit Salpetersäure und die Weidelsche Probe nicht, wohl aber die Buriansche Diazoreaktion; nur muß beim Anstellen der Probe ein größerer Ueberschuß von Natronlauge vermieden werden. — Charakteristisch für Adenin ist das Verhalten der Kristalle beim Erwärmen mit Wasser auf 53°. S. oben. — Ferner die folgende Probe von Kossel: Adenin wird in einem Reagensglase eine halbe Stunde mit Zink und Salzsäure im Wasserbade erwärmt; während dessen tritt eine vorübergehende schöne Purpurfärbung auf. Die abfiltrierte und mit Natronlauge stark alkalisch gemachte Flüssigkeit färbt sich beim Schütteln mit Luft anfänglich rubinrot, später braunrot. — Wie bereits unter Hypoxanthin bemerkt wurde, gibt auch dieses dieselbe Reaktion, nur mit schwächerer Farbenerscheinung. Guanin gibt sie nicht.

Methylxanthine, Paraxanthin und Epiguanin.

Die Hauptmasse der im Harne vorkommenden Purinbasen, der Harnpurine, bilden 1-Methylxanthin, Heteroxanthin und Paraxanthin. Bemerkenswert ist hierbei, daß gerade diese Purinbasen aus den in unseren Genußmitteln vorkommenden Basen Theobromin, Coffeïn und Theophyllin durch Abbau im Körper sich bilden. Da aber auch bei purinbasenfreier Kost Purinbasen mit dem Harne ausgeschieden werden, so können diese nur durch eine endogene Purinbildung entstanden sein. Ueber die »Methode zur Trennung der Alloxurbasen des Harns« vergl. die Originalarbeit von Krüger und Salomon [1]) sowie den betreffenden Artikel in »Hoppe-Seyler-Thierfelder«, physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse, 8. Aufl. 1909.

1-Methylxanthin.

1-Methylxanthin, $C_6H_6N_4O_2$, scheidet sich aus Wasser als farbloses Kristallpulver, aus essigsaurer Lösung in dünnen sechsseitigen Blättchen aus, ist in kaltem Wasser schwer, in Natronlauge und Ammoniak, sowie in verdünnten Säuren leicht löslich. Das salzsaure Salz kristallisiert in glasglänzenden rhombischen Blättchen und Säulen. — 1-Methylxanthin gibt die Xanthinprobe mit Salpetersäure; auf Zusatz von Natronlauge tritt eine Orangefärbung ein, ebenso gibt es die Weidelsche Probe.

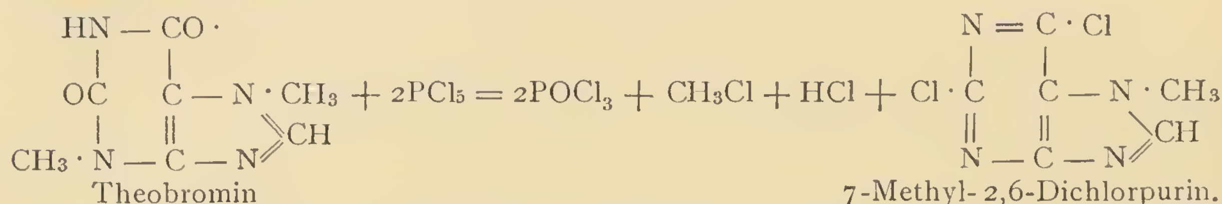
---

[1]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. 26, 373 (1898/99).

7-Methylxanthin oder Heteroxanthin.

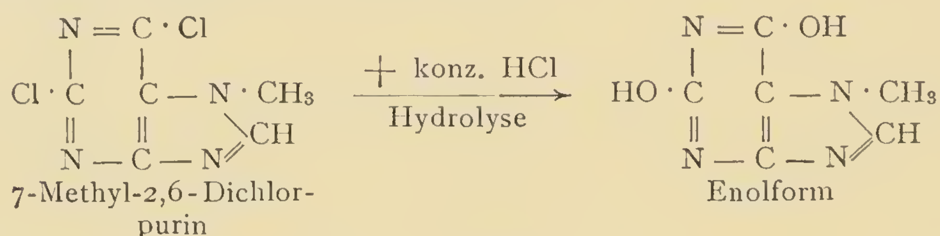
Eingegebenes Theobromin erscheint im Harn von Menschen, Hund und Kaninchen als Heteroxanthin oder 7-Methylxanthin $C_6H_6N_4O_2$.

Synthese (E. Fischer). Wird Theobromin oder 3,7-Dimethylxanthin mit Phosphorpentachlorid auf 140° erhitzt, so wird die in Stellung 3 befindliche Methylgruppe als Methylchlorid sowie aller Sauerstoff entfernt unter gleichzeitiger Bildung von 7-Methyl-2,6-Dichlorpurin.

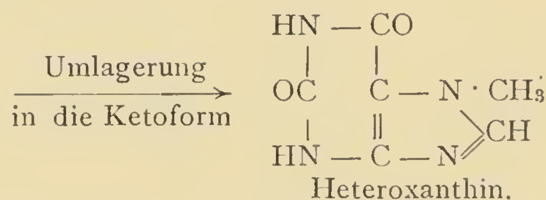


Theobromin 7-Methyl-2,6-Dichlorpurin.

Durch Erhitzen des letzteren mit konzentrierter Salzsäure auf 120—125°, also durch Hydrolyse, entsteht Heteroxanthin:



7-Methyl-2,6-Dichlorpurin Enolform



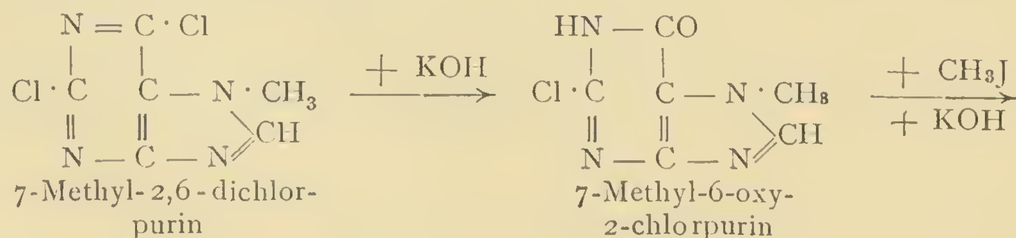
Heteroxanthin.

Heteroxanthin kristallisiert in Nädelchen, ist sehr schwer in kaltem, viel leichter in siedendem Wasser löslich, unlöslich in Alkohol und Aether. Es wird von Alkalilaugen und von Ammoniak leicht gelöst und gibt mit Salzsäure eine in langen Nadeln kristallisierende Verbindung, die durch viel Wasser wieder in die freie Base und Salzsäure leicht zerlegt wird. Heteroxanthin gibt nicht die Xanthinreaktion, wohl aber die Weidel'sche Probe.

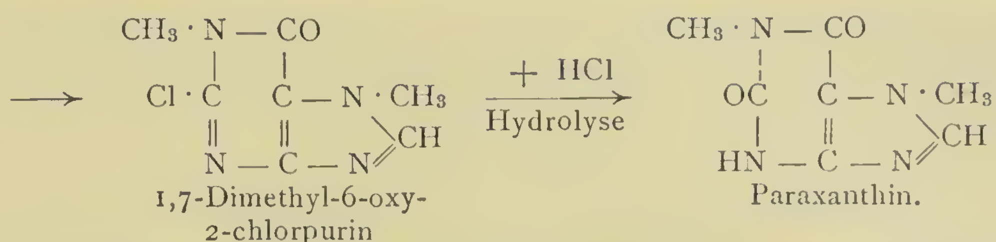
Paraxanthin.

Paraxanthin, Urotheobromin = 1,7-Dimethylxanthin, $C_7H_8N_4O_2$, ist isomer mit Theobromin und Theophyllin. Eingegebenes Koffeïn erscheint im Harn von Kaninchen und Hunden z. T. als Paraxanthin.

Synthese (E. Fischer). Das aus dem Theobromin erhältliche 7-Methyl-2,6-dichlorpurin (s. unter Heteroxanthin) wird durch wässerige Kalilauge bei 100° in 7-Methyl-6-oxy-2-chlorpurin übergeführt und letzteres mit Kalilauge und Methyljodid zu 1,7-Dimethyl-6-oxy-2-chlorpurin methyliert. Beim Erhitzen mit rauchender Salzsäure auf 125—130°, also durch Hydrolyse, geht letzteres in Paraxanthin über:



7-Methyl-2,6-dichlorpurin 7-Methyl-6-oxy-2-chlorpurin



Paraxanthin bildet farblose, glänzende, wasserfreie Kristalle vom Schmp. 295 bis 296°, ist viel leichter löslich in kaltem Wasser als Xanthin, unlöslich in Alkohol und Aether, dagegen löslich in Ammoniak, Salzsäure und Salpetersäure. Aus konzentrierteren Lösungen fällt Natronlauge Paraxanthinnatrium in langen glänzenden Tafeln und Prismen aus. Paraxanthin gibt die Xanthinprobe mit Salpetersäure und Natronlauge nicht, wohl aber gibt es die Weidel'sche Reaktion.

Epiguanin, 7-Methylguanin, $C_6H_7N_5O$, findet sich im Harne vor. Es kristallisiert aus Wasser in feinen Nadeln, ist schwer löslich in Wasser und in Ammoniak, leicht löslich in verdünnter Natronlauge, Salzsäure und Schwefelsäure, schwer in verdünnter Salpetersäure. Aus der Lösung in heißer starker Natronlauge kristallisiert die Natriumverbindung in breiten, glänzenden Nadeln. Das Pikrat kristallisiert in Blättchen oder in zu Büscheln vereinigten Nadeln, ist sehr wenig löslich in Wasser und eignet sich daher zur Identifizierung des Epiguanins; es sintert bei etwa 253° zusammen und zersetzt sich bei 257° unter Gasentwicklung. Epignanin gibt die Xanthinprobe, freilich weniger intensiv als Xanthin, ebenso die Weidel'sche Probe.

Die quantitative Bestimmung der Purinbasen und der Harnsäure im menschlichen Harn nach M. Krüger und Julius Schmidt[1]).

Von den vier zur Ausfällung der Purinkörper des Harns gebräuchlichen Reagentien Phosphorwolframsäure, Kupferacetat, ammoniakalische Silberlösung und Kupfersulfat in Verbindung mit Natriumbisulfit kommen für eine bequeme und exakte quantitative Bestimmung nur die beiden zuletzt genannten Reagentien in Betracht. Versuche von Krüger und Schmidt, angestellt mit reinem Material, haben ergeben, daß die Fällung aller in Betracht kommenden Purinbasen, einschließlich der Harnsäure, durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit eine vollständige ist, und zwar gleichgültig, ob die betreffenden Lösungen nur Purinkörper oder außerdem auch Kochsalz (von 2%) enthalten. Viel Kochsalz hindert zwar die Vollständigkeit der Fällung nicht, es verzögert aber die Bildung des Kupferoxydulniederschlags. Die durch Kochsalz verursachte Verzögerung der Purinkörperfällung wird durch Natriumacetat sofort aufgehoben.

Prinzip. Harnsäure + gesamte Purinbasen des Harns werden als Kupferoxydulverbindungen zusammen ausgefällt und diese durch Schwefelnatrium zerlegt, wobei Harnsäure und die Purinbasen in Lösung gehen. Aus der abfiltrierten wässerigen Lösung fällt Salzsäure die Harnsäure aus, und aus dem Filtrat von dieser werden die Purinbasen wieder als

---

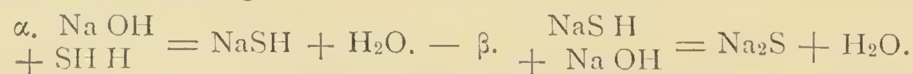
[1]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. 45, 1 (1905) sowie Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch, VIII. Aufl. 1909.

Kupferoxydul- oder Silberverbindungen abgeschieden. Schließlich wird der Stickstoff, sowohl der Harnsäure als des Purinbasengemenges, nach Kjeldahl bestimmt.

Erfordernisse. 1. Natriumbisulfitlösung (Kahlbaum). — 2. Kupfersulfatlösung (10%ig). — 3. Schwefelnatriumlösung. Man teilt eine bestimmte Menge einer 1%igen Natronlauge (bereitet mit aus Metall dargestelltem Aetznatron) in zwei Teile, sättigt die eine Hälfte mit Schwefelwasserstoff und fügt dann die zweite Hälfte hinzu [1]). — 4. Aufschwemmung von Braunstein in Wasser. Eine heiße 0,5%ige Lösung von Kaliumpermanganat wird tropfenweise mit Alkohol bis zur Entfärbung versetzt.

Ausführung. 400 ccm Harn, der, falls er eiweißhaltig ist, in der üblichen Weise vorher von Eiweiß befreit wird, werden in einem Literrundkolben mit 24 gr kristallisiertem Natriumacetat und 40 ccm der Natriumbisulfitlösung (1) versetzt, zum Kochen erhitzt und, nach Zusatz von 40—80 ccm Kupfersulfatlösung (2) — je nachdem der Harn voraussichtlich wenig oder viel Purinkörper enthält — mindestens 3 Minuten im Sieden erhalten. Der hierbei sich bildende flockige Niederschlag wird sofort oder nach dem Abkühlen der Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtriert, mit heißem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft und schließlich mit heißem Wasser in den Kolben, in welchem die Fällung vorgenommen wurde, zurückgespritzt. Man fügt noch soviel Wasser hinzu, daß die gesamte Flüssigkeitsmenge etwa 200 ccm beträgt, erhitzt zum Sieden und zersetzt den »Kupferoxydulniederschlag« [2]) durch Hinzufügen von 30 ccm der Schwefelnatriumlösung (3). In den allermeisten Fällen wird diese Menge genügen, doch hat man sich jedesmal durch einen Kontrollversuch davon zu überzeugen, daß die Fällung vollständig ist, indem man einen Tropfen der Flüssigkeit auf ein mit einem Tropfen Bleiacetatlösung befeuchtetes Filtrierpapier bringt: Braunfärbung zeigt dann einen Ueberschuß an Schwefelnatrium an. Nach vollständiger Zersetzung säuert man die Flüssigkeit mit 10%iger Essigsäure an, erhält so lange im Sieden, bis der ausgeschiedene Schwefel sich zusammengeballt hat, filtriert mit Hilfe einer Saugvorrichtung und unter Benutzung einer Porzellanfilterplatte kochend heiß ab, wäscht mit heißem Wasser aus, versetzt das Filtrat mit 10 ccm 10%iger Salzsäure und dampft es in einer 300 ccm fassenden Porzellanschale auf etwa 10 ccm ein. Während des Einengens und darauffolgenden zweistündigen Stehens in der Kälte scheidet sich die Harnsäure nahezu vollständig ab, während die Purinbasen in Lösung bleiben.

[1]) Diese Darstellung einer Lösung von Schwefelnatrium findet in den folgenden Gleichungen ihre Erklärung:



$$\alpha.\ \begin{matrix} NaOH \\ +\ SH\,H \end{matrix} = NaSH + H_2O. \quad — \quad \beta.\ \begin{matrix} NaSH \\ +\ NaOH \end{matrix} = Na_2S + H_2O.$$

[2]) Nach Krüger sind die Verbindungen, welche aus Purinkörpern durch Fällung mit Kupfersulfat und Bisulfit entstehen, nicht als reine Kupferoxydulverbindungen, sondern, da sie gleichzeitig noch Schwefelsäure enthalten, welche selbst durch andauerndes Waschen nicht entfernt werden kann, als basisch schwefelsaure Purinkupferoxydulverbindungen anzusehen.

I. Die abgeschiedene Harnsäure wird auf einem kleinen Filter gesammelt, mit schwefelsäurehaltigem Wasser so lange ausgewaschen, bis Filtrat und Waschflüssigkeit zusammen 75 ccm betragen, dann samt Filter nach Kjeldahl behandelt. Zu der aus dem gefundenen Stickstoffwert durch Multiplikation mit 3 berechneten Harnsäuremenge sind für die in 75 ccm Filtrat gelöste Harnsäure noch 3,5 mgr hinzuzuaddieren. Vgl. Bemerkungen.

II. Im Filtrate von der Harnsäure können die Purinbasen, sowohl durch Kupferfällung nach a), als auch durch Silberfällung nach b) bestimmt werden. Beide Fällungen geben unter sich übereinstimmende Werte.

a. Bestimmung mit Hilfe der Kupferfällung. Das aufgesammelte Filtrat von der abfiltrierten Harnsäure wird samt Waschwasser mit Natronlauge alkalisch gemacht, darauf mit Essigsäure schwach angesäuert, nach Erwärmen auf 70^0 oder einige Grade darüber mit $^1/_2$ bis 1 ccm 10%iger Essigsäure und zur Oxydation der noch vorhandenen Spuren von Harnsäure, mit 10 ccm Braunsteinaufschwemmung (4) versetzt und 1 Minute lang geschüttelt. Man fügt jetzt 10 ccm der Natriumbisulfitlösung, welche gleichzeitig den überschüssigen Braunstein löst, sowie 5—10 ccm der Kupfersulfatlösung (von 10%) hinzu, erhält die Flüssigkeit 3 Minuten im Sieden, filtriert den Niederschlag sofort durch ein Faltenfilter[1]), wäscht mit heißem Wasser aus und bestimmt den Stickstoffgehalt des Niederschlags nach Kjeldahl.

Bemerkungen. Der erhaltene »Kupferoxydulniederschlag« wird samt Filter in einem geräumigen Kjeldahlkolben mit 10 ccm konz. Schwefelsäure + 0,5 g Kupfersulfat + 5 g Kaliumsulfat gekocht. Anfangs schäumt das Gemisch sehr stark; es muß daher allmählich zum Sieden erhitzt werden. Bei lebhaftem Kochen ist die Oxydation in 25—30 Minuten beendigt; man erhält eine klare, grün gefärbte Lösung. — Beim Abdestillieren des gebildeten Ammoniaks bringe man 20 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder Oxalsäure in die Vorlage und nehme beim Zurücktitrieren der überschüssigen $^1/_5$ n-Säure mit $^1/_5$ n-Lauge nicht mehr als 3 Tröpfchen der Rosolsäurelösung als Indikator. — Eine Umrechnung des gefundenen Stickstoffs auf die Basen selbst erscheint unzweckmäßig, weil man dabei eine willkürlich angenommene Zusammensetzung des Basengemisches zugrunde legen müßte.

Da ein Aequivalent Säure 1 Mol. NH_3 entspricht und dieses wieder 1 At. Stickstoff, (= 14 N), so entsprechen 1000 ccm $^1/_1$ n-Säure 14 g N. und 1000 ccm $^1/_5$ n-Säure $\frac{N}{5} = \frac{14}{5} = 2{,}8$ g N. — 1 ccm $^1/_5$ n-Säure zeigt somit 0,0028 g N an. Zur Absorption des aus dem Harnsäureniederschlags (I) nach Kjeldahl erhaltenen Ammoniaks bringe man in die Vorlage 30 bis 40 ccm $^1/_5$ n-Schwefelsäure oder $^1/_5$ n-Oxalsäure.

b. Bestimmung mit Hilfe der Silberfällung. Zunächst ist das Verfahren dasselbe wie bei a). Die essigsaure Lösung, welche den überschüssigen Braunstein suspendiert enthält, wird mit Ammoniak alkalisch gemacht, abgekühlt und mit 10 ccm einer ammonia-

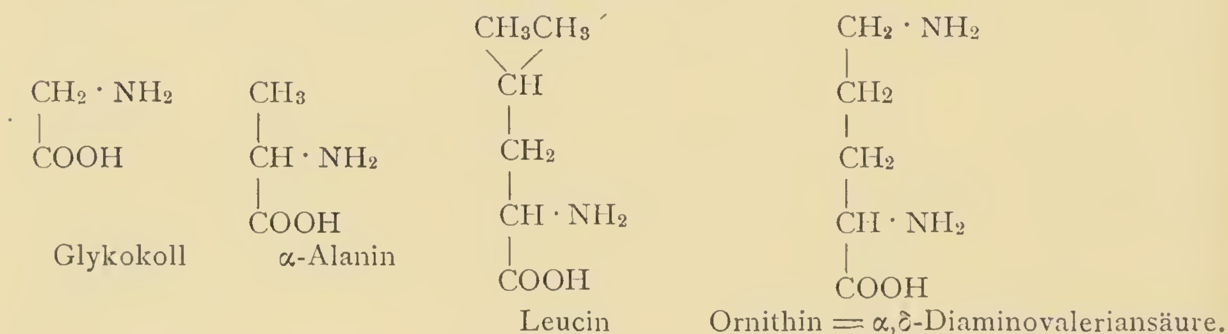
[1]) H. Thierfelder empfiehlt in seinem »Handbuch« die Verwendung von schwedischem Filtrierpapier J. H. Munktell Nr. 1.

kalischen Silberlösung [1]) sowie mit Ammoniak bis zur Lösung des Chlorsilbers versetzt. Um das Absitzen zu begünstigen und die Filtration und das Auswaschen des voluminösen Silberniederschlags der Purinbasen zu erleichtern, erzeugt man gleichzeitig in der Flüssigkeit einen Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia, indem man 10 ccm Dinatriumphosphatlösung (6%) und 5 ccm Magnesiamischung hinzufügt. Nach zweistündigem Stehen filtriert man den Niederschlag durch ein Faltenfilter ab, wäscht ihn mit kaltem Wasser möglichst ammoniakfrei, spritzt ihn mit heißem Wasser in einen Rundkolben (Kjeldahlkolben) und vertreibt das Ammoniak durch Kochen unter Zusatz von Magnesia usta (gebrannte Magnesia). Nunmehr erfolgt die Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl.

Bemerkung. Die Kupferfällung (a) ist der Silberfällung (b) in der Schnelligkeit mit der die Niederschläge entstehen und weiter verarbeitet werden können, weit überlegen.

Aminosäuren.

Wird intraradikal gebundener Wasserstoff einer Säure durch die primäre Aminogruppe NH_2 ersetzt, so entsteht eine Aminosäure. Je nach der Zahl der eingetretenen Aminogruppen unterscheidet man Mono-, Di- und Poly-Aminosäuren:



Allgemeine Eigenschaften der Aminosäuren.

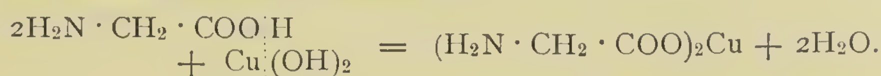
Da die Aminosäuren in ihrem Moleküle die Carboxylgruppe und mindestens eine Aminogruppe enthalten, sind sie zugleich Säuren und Basen. Als Säuren geben sie mit Metalloxyden und Metallhydroxyden Salze und lassen sich meist leicht beim Einleiten von Chlorwasserstoffgas in ihre absolut alkoholischen Lösungen esterifizieren. — Als Basen geben die Aminosäuren mit Säuren Salze, werden durch die meisten Alkaloïdreagentien — Eiweißreagentien — ausgefällt und liefern Benzoyl-, β-Naphtalinsulfo-, Phenylisocyanat- und α-Naphtylisocyanatverbindungen.

Die Amino- und Diaminosäuren sind meist gut kristallisierende Substanzen, für welche die im folgenden beschriebenen Salze und Verbindungen besonders charakteristisch sind. Derartige Abkömmlinge sucht

[1]) Man löse 2,6 g Silbernitrat in überschüssiger wässeriger Ammoniakflüssigkeit und verdünne die Lösung mit Wasser auf 100 ccm.

man daher darzustellen, wenn man eine Amino- oder Diaminosäure als solche zu identifizieren hat.

Salze. Von den Salzen sind es besonders die Kupferoxydulsalze, welche zur Identifizierung der Aminosäuren dienen können. Man erhält beispielsweise Glykokollkupfer, $[CH_2(NH_2) COO]_2 Cu + H_2O]$ in blauen Kristallnadeln, wenn man eine wässerige Glykokolllösung mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd kocht und die abfiltrierte Lösung zur Kristallisation eindunstet:



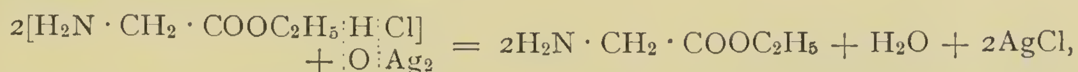
$$2H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH + Cu(OH)_2 = (H_2N \cdot CH_2 \cdot COO)_2Cu + 2H_2O.$$

Ester. Th. Curtius[1]) hat zum ersten Male den salzsauren Aethylester des Glykokolls dargestellt und zwar durch Einleiten von Salzsäuregas in eine Lösung des Glykokolls in absolutem Alkokol:



$$H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH + HCl + C_2H_5OH = HCl \cdot H_2N \cdot CH_2 \cdot COOC_2H_5 + H_2O.$$

Bringt man eine konzentrierte wässerige Lösung des salzsauren Esters mit der berechneten Menge Silberoxyd zusammen, so erhält man den freien Glykokolläthylester:



$$2[H_2N \cdot CH_2 \cdot COOC_2H_5 \cdot HCl] + OAg_2 = 2H_2N \cdot CH_2 \cdot COOC_2H_5 + H_2O + 2AgCl,$$

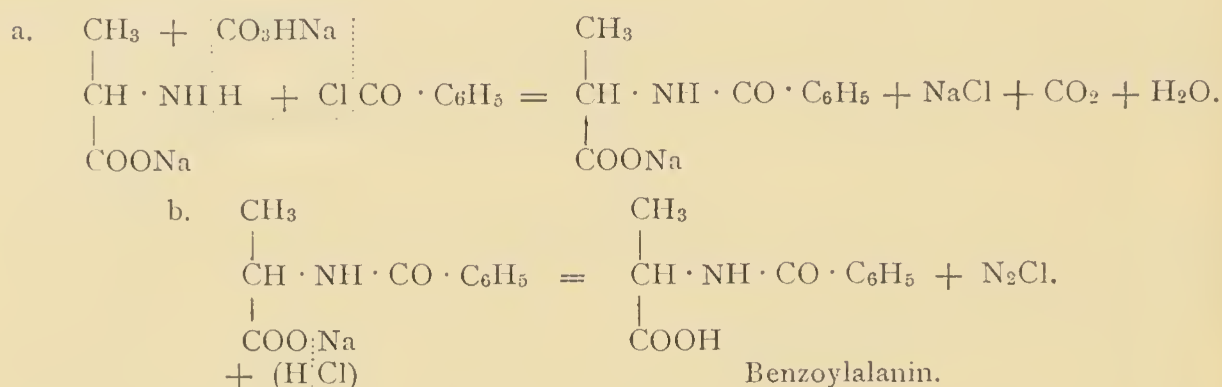
der ein farbloses, flüchtiges Oel von stark basischen Eigenschaften bildet. E. Fischer[2]) hat das Silberoxyd durch konzentrierte wässerige Natronlauge ersetzt. Fügt man hierbei unter sorgfältiger Kühlung in einer Kältemischung gleichzeitig noch viel Kaliumkarbonat hinzu, so lassen sich die Aminosäureester vollständig ausäthern. Es muß so viel trockenes gekörntes Kaliumkarbonat zugefügt werden, daß sich die wässerige Schicht in einen dicken Brei verwandelt, der noch 2 oder 3 mal mit wenig Aether kräftig ausgeschüttelt wird. Die vereinigten Aetherauszüge läßt man zuerst etwa 10 Minuten mit trockenem Kaliumkarbonat, dann mehrere Stunden mit etwas wasserfreiem Natriumsulfat unter häufigem Umschütteln stehen. Beim Verdampfen des Aethers bleiben die Ester der Aminosäuren als farblose, alkalisch reagierende, in Wasser unlösliche, in Alkohol, Aether und Benzol leicht lösliche Flüssigkeiten zurück, die unter vermindertem Druck sich unzersetzt destillieren lassen. Durch Kochen mit Wasser werden sie hydrolytisch gespalten.

Benzoylverbindungen. Die Benzoylderivate der Aminosäuren erhält man am leichtesten und mit guter Ausbeute nach dem von Emil Fischer[3]) modifizierten Verfahren von Schotten-Baumann. Man schüttelt die wässerige Lösung der Aminosäure mit viel zerriebenem Natriumbikarbonat und einem großen Ueberschusse von Benzoylchlorid, das immer nur in kleinen Mengen zugegeben wird, tüchtig durch und so lange, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist. Dann

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 16, 753 (1883).
[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 34, 433 (1901).
[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 32, 2451 (1899).

säuert man die abfiltrierte Flüssigkeit mit Salzsäure an, läßt das Gemisch zur vollständigen Abscheidung der benzoylierten Aminosäuren einige Stunden, am besten in Eiswasser, stehen, filtriert den gebildeten Niederschlag ab, trocknet und kocht ihn zur Entfernung von anhaftender Benzoësäure wiederholt mit Ligroin (Siedep. etwa 70°) aus. Durch einmaliges Umkristallisieren des hierbei ungelöst bleibenden Teiles aus heißem Wasser wird dann die benzoylierte Aminosäure meist rein erhalten.

Durch das Benzoylieren bei Gegenwart von überschüssigem Natriumbikarbonat wird selbstverständlich zunächst das Natriumsalz der benzoylierten Aminosäure erhalten, die dann durch Salzsäure gefällt wird:



a. $$CH_3 + CO_3HNa \,|\, CH\cdot NH\,H\,(COONa) + Cl\,CO\cdot C_6H_5 = CH_3\cdot CH(NH\cdot CO\cdot C_6H_5)\cdot COONa + NaCl + CO_2 + H_2O.$$

b. $$CH_3\cdot CH(NH\cdot CO\cdot C_6H_5)\cdot COO{:}Na + (H{:}Cl) = CH_3\cdot CH(NH\cdot CO\cdot C_6H_5)\cdot COOH + N_2Cl.$$

Benzoylalanin.

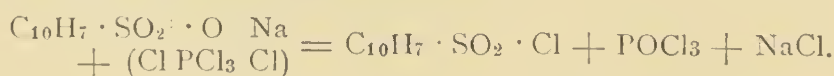
β-Naphthalinsulfoverbindungen. Emil Fischer und P. Bergell[1]) haben das Schotten-Baumannsche Benzoylierungsverfahren auf das β-Naphthalinsulfochlorid $C_{10}H_7 . SO_2 . Cl$[2]) übertragen. Die Wechselwirkung zwischen dem Sulfochlorid und der Aminosäure vollzieht sich am besten unter folgenden Bedingungen:

Man löst das β-Naphthalinsulfochlorid (2 Mol) in Aether, fügt die Lösung der Aminosäure in der für ein Molekül berechneten Menge $^1/_1$ n-Natronlauge hinzu und schüttelt mit Hilfe einer Maschine bei gewöhnlicher Temperatur. In Zwischenräumen von 1 bis $1^1/_2$ Stunden fügt man dann noch dreimal die gleiche Menge $^1/_1$ n-Natronlauge hinzu. Ein Ueberschuß des β-Naphthalinsulfochlorid ist für die Ausbeute vorteilhaft. Da es nicht vollständig verbraucht wird, ist die wässerige Lösung zum Schluß noch alkalisch. Diese wird von der ätherischen Schicht getrennt, filtriert, wenn nötig mit Tierkohle geklärt und schließlich mit Salzsäure angesäuert. Dabei fällt die schwer lösliche β-Naphthalinsulfoverbindung aus, die schließlich aus heißem Wasser oder verdünntem Alkohol umkristallisiert wird:

---

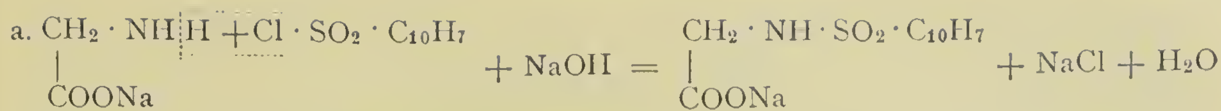
[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3779 (1902).

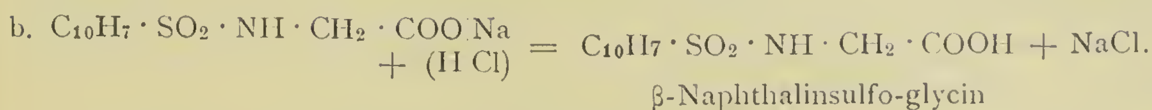
[2]) β-Naphthalinsulfochlorid erhält man aus β-naphthalinsulfosaurem Natrium mit Hilfe von Fünffach Chlorphosphor:



$$C_{10}H_7\cdot SO_2\cdot O\,Na + (Cl\,PCl_3\,Cl) = C_{10}H_7\cdot SO_2\cdot Cl + POCl_3 + NaCl.$$

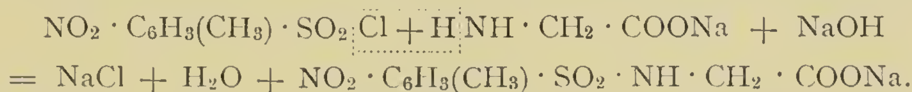
Durch Umkristallisieren aus Benzol wird es in Blättchen vom Schmp. 76—78° erhalten, die in Aether, Chloroform und Benzol löslich sind.





β-Naphthalinsulfo-glycin

4-Nitrotoluol-2-sulfoverbindungen. M. Siegfried[1]) empfiehlt zur Identifizierung der als Spaltungsstücke der Eiweißkörper hervorgehenden Aminosäuren die Darstellung der 4-Nitrotoluol-2-sulfoverbindungen, die, soweit untersucht, ein ausgezeichnetes Kristallisationsvermögen besitzen, überdies schwer löslich in Wasser sind, scharf schmelzen und zudem sehr glatt entstehen. Sie eignen sich daher zur Abscheidung und Charakterisierung der Aminosäuren. Die Darstellung dieser Derivate geschieht in der von E. Fischer und P. Bergell für die Derivate der β-Naphthalinsulfosäure angegebenen Weise, also durch Schütteln der alkalischen Lösung der Aminosäure mit der ätherischen Lösung des 4-Nitrotoluol-2-sulfosäurechlorides, $NO_2 . C_6H_3 (CH_3) . SO_2 . Cl$)[2]). Z. B. werden 2 g Glykokoll, in 30 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge gelöst, mit der ätherischen Lösung von 7 g des Sulfochlorids gegeschüttelt und dazu allmählich 70 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge gegeben. Im ganzen wird 1 Stunde geschüttelt. Aus der abgehobenen wässerig-alkalischen Lösung scheidet überschüssige Salzsäure 4-Nitrotoluol-2-sulfoglycin $NO_2 . C_6H_3(CH_3) . SO_2 . NH . CH_2 . COOH$ in großen perlmutterglänzenden Blättchen vom Schmp. 177.5—171° aus. Beim Umkristallisieren aus heißem Wasser werden lange Nadeln und Blättchen erhalten:

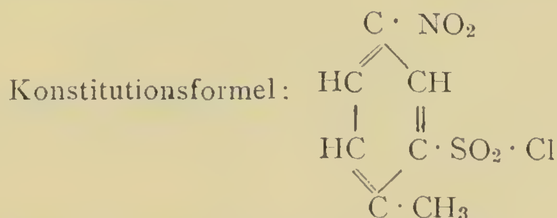


Phenylisocyanatverbindungen nach C. Paal[3]). Leicht und mit fast quantitativer Ausbeute gelingt die Darstellung von Phenylureïdosäuren, wenn man Phenylisocyanat $C_6H_5N:CO$, auf die wässerigen Lösungen der Kalium- oder Natriumsalze der Aminosäuren einwirken läßt.

Zur Darstellung der Phenylureïdosäuren werden in einem enghalsigen Kolben äquimolekulare Mengen der betreffenden Aminosäure und des festen Aetznatron in Wasser gelöst, und zwar verwendet man zweckmäßig auf 1 Tl. Säure 8—10 Tle. Wasser. Hierauf gibt man die berechnete Menge Phenylisocyanat (1 Mol.) hinzu und schüttelt bis zum

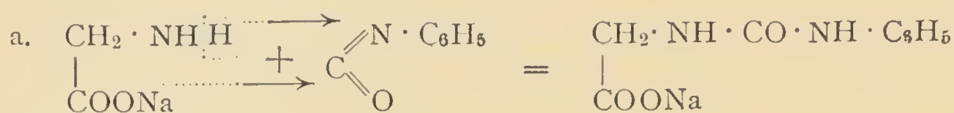
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 68 (1904/05).

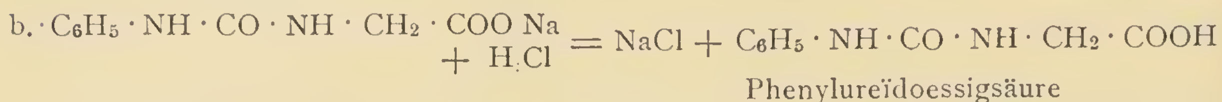
[2]) 4-Nitrotoluol-2-sulfochlorid kristallisiert aus Aether in rhombischen Tafeln vom Schmelzpunkt 43—44,5°.



[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 27, 974 (1894).

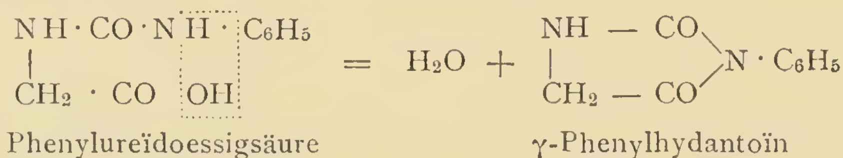
Verschwinden des Cyanatgeruches. Arbeitet man mit größeren Mengen, so tritt während der Reaktion eine beträchtliche Erwärmung ein, so daß für gute Kühlung gesorgt werden muß. — Ist die Reaktion beendigt, so erhält man eine Lösung, welche das Salz der gebildeten Phenylureïdosäure enthält und aus welcher die Ureïdosäure selbst, frei von Nebenprodukten und in fast quantitativer Ausbeute, durch verdünnte Schwefel- oder Salzsäure gefällt wird:





Die Phenylureïdoessigsäure kristallisiert aus Wasser in prächtigen, farblosen, dezimeterlangen Spießen vom Schmp. 195°, ist leicht in ätzenden und kohlensauren Alkalien, mäßig in Alkohol, fast gar nicht löslich in Aether, Chloroform und Benzol.

Die Phenylureïdosäuren lassen sich, wie A. Mouneyrat[1]) in E. Fischer's Laboratorium gefunden hat, durch Wasserabspaltung in die entsprechenden Hydantoïne überführen:



2 g Phenylureïdoessigsäure werden in 160 g Salzsäure (sp. Gew. 1,124) heiß gelöst, dann wird die Lösung auf $^1/_4$ ihres Volumens eingekocht; beim Erkalten scheidet sich das Phenylhydantoin in prächtigen Nadeln ab, das aus der 50-fachen Menge Wasser umkristallisiert werden kann. Die Gesamtausbeute beträgt 90—95 % der Theorie.

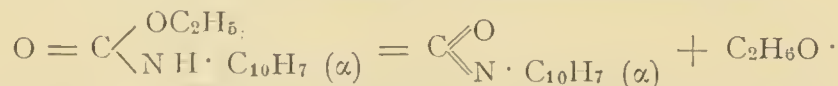
α-Naphtylisocyanatverbindungen. C. Neuberg und A. Manasse[2]) haben zur Isolierung der Aminosäuren an Stelle des Phenylisocyanats das α-Naphtylisocyanat[3]) empfohlen.

Vor dem Phenylisocyanat zeichnet sich das letztere dadurch aus, daß es wegen seines viel höheren Siedepunktes keine giftigen Dämpfe entwickelt, daß es gegen Wasser viel beständiger ist und ohne jede Kühlung mit der alkalischen Lösung einer Aminosäure zusammengebracht werden kann. Nach beendigter Reaktion filtriert man den ganz unlöslichen Dinaphtylharnstoff ab, in den der Ueberschuß des α-Naphtylisocyanats sich vollständig verwandelt. Ferner werden die gebildeten Naphtylhydantoïnsäuren nicht nur quantitativ, sondern auch in

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 33, 2393 (1900).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2359 (1905).

[3]) A. W. v. Hofmann hat das α-Naphtylisocyanat zuerst dargestellt und zwar aus α-Naphtylurethan mittels Phosphorsäureanhydrid:



Es bildet eine stechend riechende Flüssigkeit vom Siedep. 279—280°.

einem solchen Grade der Reinheit erhalten, daß ihre Umwandlung unter Wasserabspaltung in die entsprechenden *Naphtylhydantoïne* durch Kochen mit Säuren unnötig ist. Für die Darstellung des *α-Naphtylisocyanat-Glykokolls*, $C_{10}H_7 . NH . CO . NH . CH_2 \cdot COOH$, geben die genannten Autoren die folgende Vorschrift:

0,75 g Glykokoll werden in 60 ccm Wasser und 10 ccm 1/1 n-Kalilauge gelöst, mit 2 g Naphtylisocyanat (= 5/4 Mol. auf 1 Mol. der Aminosäure) versetzt und öfters umgeschüttelt. Nach ca. 3/4 Stunden wird vom Dinaphtylharnstoff abfiltriert, dieser gut ausgewaschen und das Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Dieses erstarrt zu einem Kristallbrei von Naphtylhydantoïnsäure, die nach einiger Zeit abgesaugt und aus verdünntem Alkohol umkristallisiert wird. Durch Erhitzen mit Barytwasser lassen sich die Aminosäuren aus ihren α-Naphtylisocyanatverbindungen wieder zurückgewinnen.

Vorkommen der Aminosäuren im Harn.

Der *normale* menschliche Harn enthält höchstens *Spuren* von Aminosäuren. Von den als Spaltstücke bei der Hydrolyse der *Eiweißstoffe* entstehenden Aminosäuren hat man im normalen Harn bis jetzt nur das *Glykokoll* sicher nachgewiesen; vielleicht findet sich auch *Histidin* darin vor. Außer diesen beiden Aminosäuren können im pathologischen Harne auch *Leucin*, *Tyrosin*, *Arginin* und *Cystin* (Alanin?) vorkommen. Dies ist vorzugsweise bei gewissen Lebererkrankungen, ferner bei Typhus, Diabetes und Phosphorvergiftung der Fall. Im Harn von Hunden nach Phosphorvergiftung und Pankreasexstirpation sind die genannten Aminosäuren ebenfalls reichlich nachgewiesen worden.

Glykokoll.

Glykokoll, Aminoessigsäure, Glycin, Leimsüß, $H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH$, entsteht bei der Spaltung vieler Proteïnstoffe und ist vielleicht in jedem normalen Menschenharn enthalten. Es ist in größerer Menge nachgewiesen im Harn von Menschen, Hunden und Kaninchen, die durch Phosphor vergiftet waren. A. *Ignatowski*[1]) hat mit Hilfe des β-Naphthalinsulfochloridverfahrens (s. oben) das Vorkommen von Glykokoll im Harn bei *Gicht* mit aller Sicherheit festgestellt, bei *Pneumonie* zur Zeit der Krise und bei *Leukämie* aber wahrscheinlich gemacht.

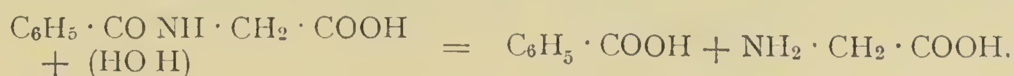
Darstellung. 1. Aus *Monochloressigsäure* und Ammoniak:



$$NH_2H + ClCH_2 \cdot COOH = HCl + NH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH.$$

Hierbei werden freilich nur Spuren von Glycin erhalten, besser ist die Ausbeute bei Benutzung von Soda + Ammoniak (16—18%) oder von Ammoniumkarbonat (20% der theoretischen Menge).

2. Aus *Hippursäure* (s. diese) durch Kochen mit konz. Salzsäure unter Rückfluß während 1 Stunde oder durch Erhitzen mit Alkalilauge:



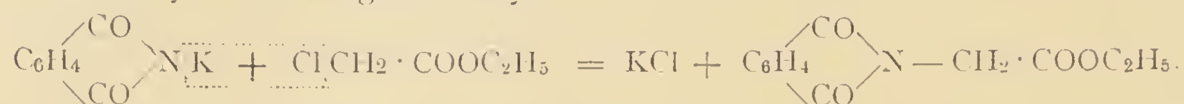
$$\begin{matrix} C_6H_5 \cdot CO\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH \\ + (HO\,H) \end{matrix} = C_6H_5 \cdot COOH + NH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH.$$

---

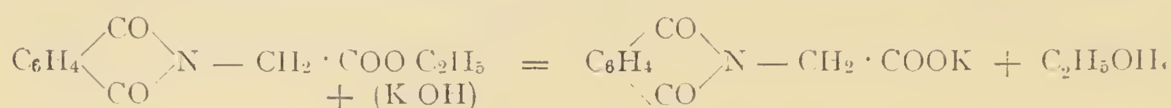
[1]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. 42, 371 (1904).

Verwendet man Salzsäure für die Hydrolyse der Hippursäure, so erhält man eine Lösung von salzsaurem Glykokoll: $HCl.NH_2.CH_2.COOH$.

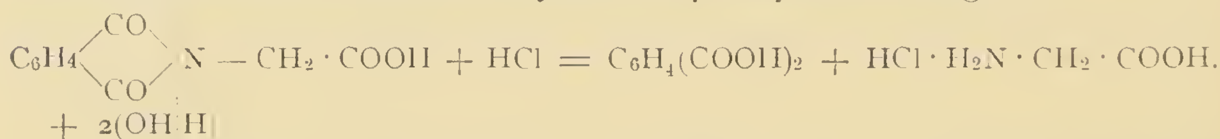
3. Durch Erhitzen molekularer Mengen von Phtalimidkalium[1]) mit Chloressigsäureäthylester unter Rückfluß auf ca. 150° entsteht Phtalylamidoessigsäureäthylester:



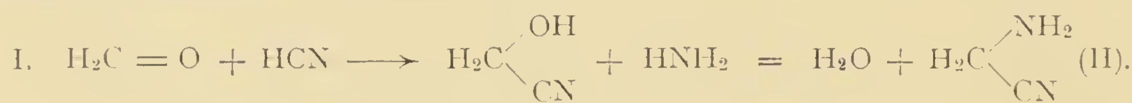
der beim Erhitzen mit 10%iger Kalilauge (2 Mol.) glatt verseift wird:

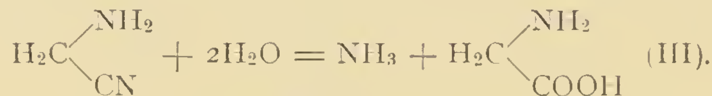


Die aus ihrem Kaliumsalze mit einer Mineralsäure frei gemachte Phtalylamidoessigsäure wird durch kochende 20%ige Salzsäure in Phtalsäure und salzsaures Glykokoll hydrolytisch zerlegt:



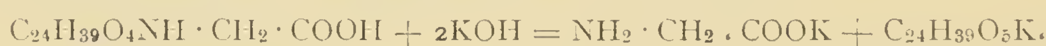
4. Methylencyanhydrin, erhalten aus Formaldehydlösung (40%ig) und Blausäure (I), wird mit 30%igem Ammoniak in Amidoacetonitril (II) übergeführt, das bei der Verseifung mittels Barytwasser Glykokoll (III) liefert:





(Darstellung von Glykokoll.)

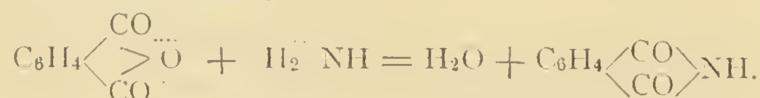
5. Bei anhaltendem Kochen von Glykocholsäure mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure, ebenso beim Kochen mit Alkalilaugen oder heiß gesättigtem Barytwasser, neben Cholsäure:



Glykocholsäure Glykokollkalium + Cholsaures Kalium.

Eigenschaften. Glykokoll bildet große, harte, farblose, monokline Kristalle von süßem Geschmack, welche sich bei 228° bräunen und bei 232—236° unter Gasentwicklung schmelzen. Es ist löslich in 4.3 Tl. kaltem Wasser, unlöslich in kaltem Alkohol oder Aether. Die wässerigen Lösungen des Glykokolls reagieren sauer und färben sich mit Eisenchlorid tief rot. — Als Aminosäure gibt Glykokoll sowohl mit Säuren wie mit Basen Salze. Salzsaures Glykokoll, $C_2H_5NO_2.HCl$, zerfließliche, in Wasser sehr leicht, in absolutem Alkohol schwer lösliche Kristalle. — Salpetersaures Glykokoll, $C_2H_5NO_2.HNO_3$,

[1]) Phtalimid wird dargestellt durch Ueberleiten von trockenem Ammoniakgas über erwärmtes Phtalsäureanhydrid:



Nadeln oder monokline Tafeln, die gegen 145° unter Gasentwicklung schmelzen. Ueber Kupferglykokoll, $(NH_2 . CH_2 . COO)_2Cu + H_2O$, s. oben. — Glykokoll ist gegen kochende Säuren und Alkalilaugen, selbst gegen 33%ige Kalilauge, sehr widerstandsfähig. — Phosphorwolframsäure fällt verdünntere Glykokolllösungen nicht aus, wohl aber Bleiessig in Verbindung mit Ammoniak. — Beim Erwärmen von Glykokoll mit absolutem Alkohol unter Einleiten von Salzsäuregas auf dem Wasserbade entsteht der salzsaure Glykokollester, Nadeln vom Schmp. 144°. — β-Naphthalinsulfoglycin, (β) $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH_2 . COOH$, langgestreckte, manchmal zugespitzte Metallblätter, häufig büschelförmig verwachsen, kristallisiert aus heißem Wasser, sintert bei 151° zusammen und schmilzt bei 156°. —

Ueber 4-Nitrotoluol-2sulfoglycin, lange Nadeln aus heißem Wasser, Schmp. 178°, Phenylureïdoessigsäure, Phenylhydantoin, α-Naphtylisocyanat-Glykokoll (s. oben).

Nachweis des Glykokolls im Harn nach G. Embden und H. Reese [1]).

Man fällt den sauer reagierenden Harn (500—1000 ccm), ev. nach Zusatz von Essigsäure mit Bleiacetat vollständig aus, entfernt aus dem Filtrate mit Schwefelwasserstoff gelöstes Blei und aus dem hierbei gewonnenen Filtrate durch einen Luftstrom den Schwefelwasserstoff. Zur Entfernung der Hippursäure wird der mit einer Mineralsäure angesäuerte Harn entweder 16—20 Stunden im Kutscher-Steudel'schen Extraktionsapparate mit Aether extrahiert, wobei eine Spaltung der Hippursäure nicht eintritt, oder es wird sechsmal mit einem Fünftel seines Volumens Essigäther je 20—30 Minuten auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die Hauptmasse des Essigäthers wird durch dreimaliges Schütteln mit großen Aethermengen entfernt. Dem so vorbereiteten Harn wird soviel Natronlauge zugefügt, daß ein blaues Lackmuspapier eben nicht mehr gerötet wird, dann eine weitere Menge $^1/_1$ n-Natronlauge, so daß ein rotes Lackmuspapier intensiv blau gefärbt wird. Auf 1 Liter Harn werden in der Regel 20—40 ccm $^1/_1$ n-Lauge verbraucht, so daß der Gehalt an freiem Alkali 0,08—0,16% beträgt. Die alkalische Flüssigkeit wird 2 Tage lang mit 10%iger ätherischer β-Naphthalinsulfochloridlösung (etwa 4 g Sulfochlorid pro l Harn) unter öfterem Zusatz von Alkali und Reagens, (4—6 Mal pro Tag, bei etwa 30° auf der Maschine geschüttelt. Die in einem Scheidetrichter von der ätherischen Schicht getrennte wässerige Flüssigkeit wird filtriert, mit einem reichlichen Ueberschuß von Salzsäure versetzt und zwei bis drei Mal mit etwa $^1/_6$ des Volums Aether geschüttelt. Die vereinigten Aetherauszüge werden wiederholt mit kleinen Wassermengen gewaschen, filtriert und entweder im Vacuum eingeengt oder der freiwilligen Verdunstung überlassen. Der bleibende amorphe Aetherrückstand besteht im wesentlichen aus β-Naphthalinsulfamid, $C_{10}H_7 \cdot SO_2 \cdot NH_2$ und β-Naphthalinsulfoglycin. Zur Entfernung des ersteren wird der erhaltene Aetherrückstand mit der zehnfachen Menge Wasser übergossen und vorsichtig mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Die Hauptmasse geht sofort in Lösung, und es bleibt ein äußerst feinkörniger, kristallinischer Anteil ungelöst. Man läßt nun die Flüssigkeit mit dem Niederschlag erst auf dem erwärmten Wasserbade so lange stehen, bis die Reaktion annähernd neutral geworden ist, dann noch bei Zimmertemperatur bis zum andern Tage. Nun filtriert man wiederholt durch ein Doppelfilterchen und erhält so ein

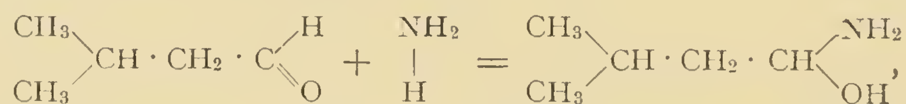
[1]) Hofmeisters Beiträge 7, 411 (1906).

klares oder schwach opalisierendes Filtrat (F). Der Filterrückstand liefert beim Umkristallisieren aus heißem Wasser reines β-Naphthalinsulfamid vom Schmp. 216—217°. — Das erhaltene klare oder opalisierende Filtrat (F), welches das β-Naphthalinsulfoglycin gelöst enthält, wird angesäuert und dreimal mit Aether gut ausgeschüttelt; der Rückstand dieser Aetherauszüge liefert beim Umkristallisieren aus warmem Wasser meist schon nahezu reines β-Naphthalinsulfoglycin vom Schmp. 153—154°. Ev. ist ein öfteres Umkristallisieren aus warmem Wasser erforderlich.

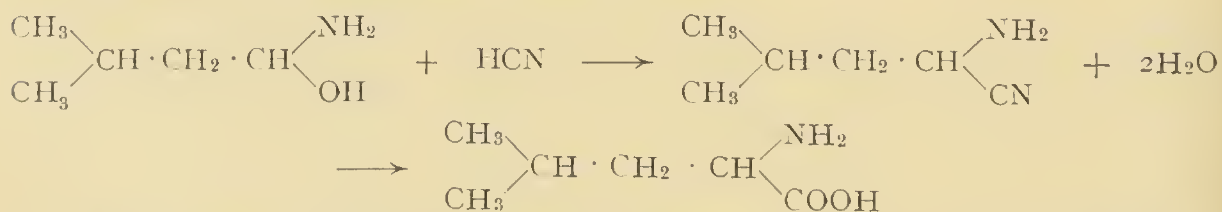
Leucin.

Leucin, α-Aminoisobutylessigsäure, $C_6H_{13}NO_2$, $(CH_3)_2CH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$, entsteht bei der Hydrolyse fast aller Eiweißstoffe und ist in Spuren in vielen Organen nachgewiesen, besonders reichlich in der Leber bei Phosphorvergiftung. Ob Leucin im normalen Menschenharn vorkommt, ist noch nicht sicher entschieden. E. Abderhalden und A. Schittenhelm[1]) haben im Harn eines an Cystinurie leidenden Mannes erheblichere Mengen von Tyrosin und, mit Hilfe der β-Naphthalinsulfochloridmethode, auch von Leucin nachgewiesen. Dieser Befund ist insofern von Interesse, als er zeigt, daß sich die bei Cystinurie auftretende Störung des Eiweißstoffwechsels nicht ausschließlich auf den einen Cystinkomplex erstreckt, sondern vielmehr eine mehr allgemeine Störung des Eiweißabbaues darstellt. Von Kirkbride wurde Leucin aus dem Harn eines Erysipelkranken, von Abderhalden und Barker[2]) aus dem Harn eines Hundes nach Phosphorvergiftung und von Wohlgemuth[3]) aus dem eines Menschen erhalten und zwar ebenfalls nach Phosphorvergiftung. Bei akuter gelber Leberatrophie tritt Leucin in ansehnlicherer Menge im Harn des Menschen auf.

Darstellung. 1. Isovaleraldehyd, mit konzentriertem wässerigem Ammoniak geschüttelt, erstarrt zu kristallinischem Isovaleraldehydammoniak



der, erst mit Blausäure, dann mit starker Salzsäure behandelt razemisches Leucin liefert, indem das intermediär auftretende Amidonitril durch die Mineralsäure verseift wird:

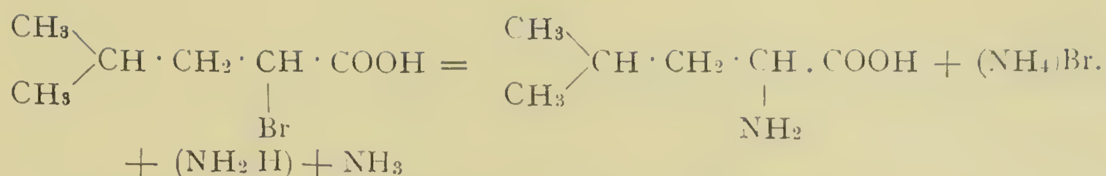


Durch diese Synthese ist die Konstitution des r-Leucins gegeben.

2. Aus α-Bromisokapronsäure mit konz. Ammoniak:

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 468 (1905).
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 524 (1904).
3) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 74 (1905).



Spaltung des razemischen Leucins. Aus dem benzoylierten inaktiven Leucin läßt sich durch Darstellung des Cinchonin- und Chinidinsälzes d- und l-Benzoylleucin darstellen, welche durch hydrolytische Spaltung d- und l-Leucin liefern. — Bequemer läßt sich die Spaltung des Leucins in die optisch aktiven Komponenten mittelst der Formylverbindung $(CH_3)_2CH . CH_2 . CH(NH . CHO) . COOH$ ausführen. E. Fischer und O. Warburg[1]).

Inaktives Leucin wird durch Kochen mit wasserfreier Ameisensäure in das Formyl-dl-Leucin übergeführt und durch Darstellung des Brucinsalzes in absolut alkoholischer Lösung gelingt die Trennung der optisch aktiven Antipoden, indem das schwerer lösliche Brucinsalz des Formyl-d-Leucins zuerst auskristallisiert. Aus der Mutterlauge wird das Formyl-l-Leucin erhalten, das bei der Hydrolyse nämlich beim Kochen mit 10%iger Salzsäure reines l-Leucin liefert.

Eigenschaften. Reines l-Leucin kristallisiert in glänzend weißen, dünnen und leichten Kristallblättchen, löst sich bei 20° in ca. 45 Tl. Wasser, sehr schwer in kaltem, etwas leichter in siedendem Alkohol. dl-Leucin löst sich schwerer in Wasser. Bemerkenswert ist, daß das nicht ganz reine Leucin in Wasser und besonders in Alkohol erheblich leichter löslich ist als das reine Leucin und zwar kristallisiert es dann in runden Kugeln und Knollen. Als Aminosäure löst sich Leucin in Alkalilaugen, in Ammoniak und in verdünnten Säuren; in Eisessig löst es sich leichter als Tyrosin, eine Eigenschaft, die zur Trennung der beiden Aminosäuren benutzt werden kann. Das reine Leucin sublimiert beim Erhitzen schon weit unter seinem Schmelzpunkt in flockigen, weißen Massen und zwar unter Verbreitung des Geruchs von Isoamylamin. Das inaktive Leucin schmeckt schwach süß, das d-Leucin ausgesprochen süß, während das l-Leucin einen faden und ganz schwach bitteren Geschmack zeigt. Im geschlossenen Kapillarröhrchen erhitzt, schmilzt Leucin bei 293—95° unter Gasentwicklung. l-Leucinkupfer, $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$, blaßblaue, in Wasser sehr schwer lösliche Schüppchen.

Leucinäthylester bildet eine farblose, alkalisch reagierende Flüssigkeit, die unter 12 mm Druck bei 83,5°, unter 761 mm bei 190° siedet, in 23 Tl. Wasser von Zimmertemperatur löslich, wird aus seiner wässerigen Lösung durch konzentrierte Alkalilauge oder Kaliumkarbonat wieder abgeschieden. Durch mehrstündiges Kochen mit Wasser unter Rückfluß wird der Ester gespalten. Der razemische Leucinäthylester wird durch Pankreasferment asymmetrisch verseift, indem neben dem natürlich vorkommenden l-Leucin der d-Leucinester erhalten wird (O. Warburg[2])

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38, 3997 (1905)

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38, 187 (1905).

Benzoyl-l-Leucin, Kristalle vom Schmp. 105°, Benzoyl-dl-Leucin schmilzt bei 135—139°.

β-Naphthalinsulfo-l-leucin, lange, sehr dünne Prismen aus 20%igem Alkohol, sintert bei 60°, schmilzt vollständig bei 67°, ist in etwa 400 T. kochendem Wasser, leicht in Alkohol und Aether löslich.

dl-Phenylisocyanatleucin, farblose Nadeln aus einer Lösung in warmem Alkohol, die mit heißem Wasser bis zur Trübung versetzt ist, schmilzt bei 165°.

l-α-Naphtylisocyanatleucin, lange Prismen vom Schmp. 163,5°.

Nachweis und Isolierung des Leucins aus Harn.

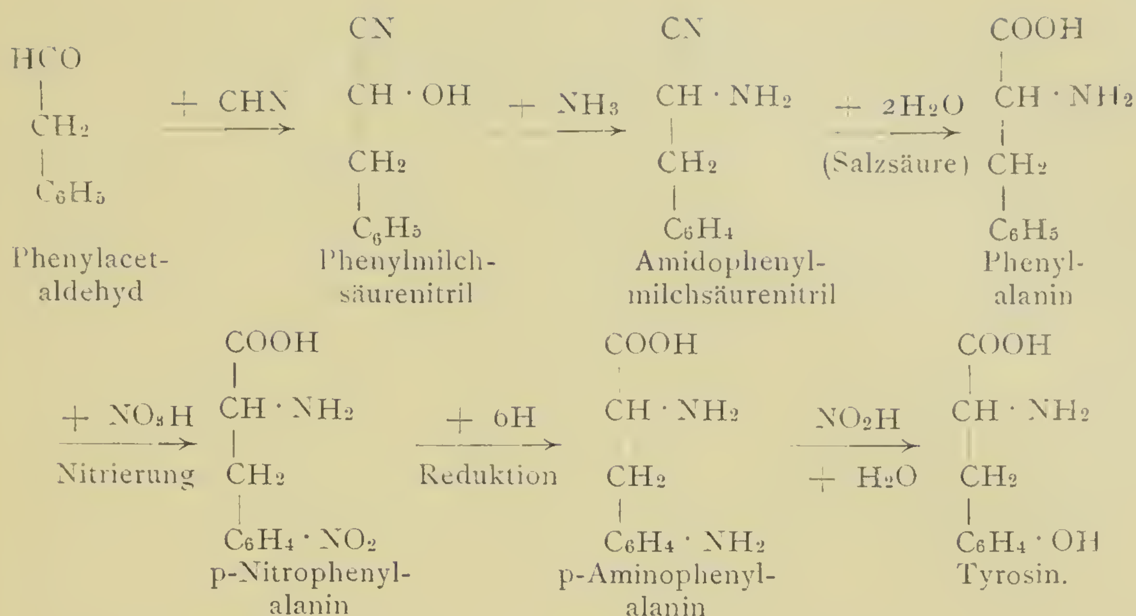
Harne, die reich an Leucin, dann meist auch reich an Tyrosin sind, wie dies bei akuter gelber Leberatrophie der Fall sein kann, liefern schon beim Eindampfen auf ein kleineres Volumen, auf etwa $^1/_3$ des ursprünglichen Harns, Kristalle von Tyrosin. Filtriert man diese nach 24stündigem Stehen an einem kühlen Orte ab, so bekommt man bei weiterem Eindampfen manchmal einen dicken Kristallbrei von Leucinkugeln, die nach dem Auswaschen mit sehr verdünntem Alkohol aus Wasser oder verdünntem Alkohol umkristallisiert werden. Das Leucin wird erkannt durch das Aussehen seiner Kristalle und sein Verhalten bei der Sublimation, wobei der charakteristische Amylamingeruch auftritt.

Tyrosin.

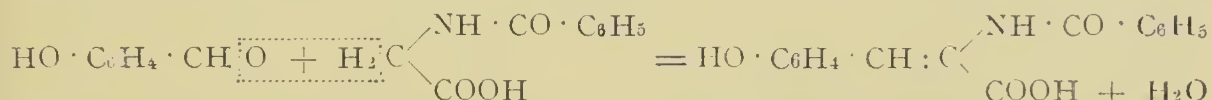
Tyrosin oder para-Oxyphenyl-α-Aminopropionsäure, $C_9H_{21}NO_3$, $HO.C_6H_4.CH_2.CH(NH_2).COOH$ findet sich im Harn bei gewissen Erkrankungen der Leber, wie bei der gelben Leberatrophie und bei schweren Phosphorvergiftungen. Im Harn eines Cystinurikers, ebenso in dem eines Diabetikers hat es Abderhalden und Schittenhelm[1]) nachgewiesen. Tyrosin entsteht bei der Hydrolyse der Eiweißstoffe durch Säuren, Alkalien, Fermente und Mikroorganismen.

Synthesen: 1. Phenylacetaldehyd nimmt, wie alle Aldehyde, Cyanwasserstoff additionell auf und bildet Phenylmilchsäurenitril, das sich mit Ammoniak zu dem Nitril des Phenylalanins umsetzt. Dieses geht durch »Nitrilverseifung« mit Salzsäure in Phenylalanin über und letzteres liefert durch Nitrierung p-Nitrophenylalanin, das sich zu p-Aminophenylanin reduzieren läßt. Wird dieses mit salpetriger Säure behandelt, so entsteht über das Diazoprodukt Tyrosin (E. Erlenmeyer sen. und Lipp, Liebig's Ann. 219, 161):

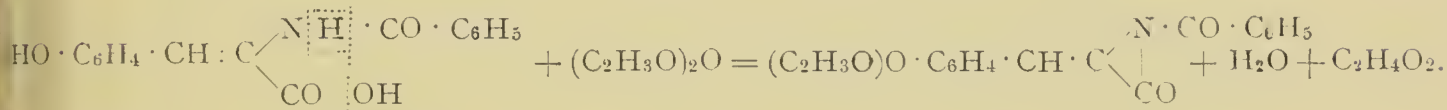
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 468 (1905).



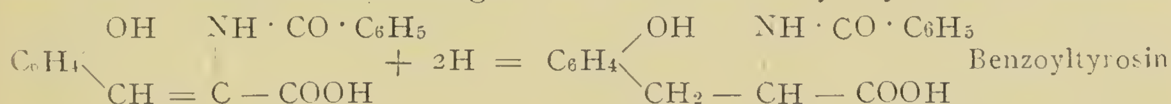
2) Nach E. Erlenmeyer jun. und J. T. Halsey[1]). Beim Erwärmen von p-Oxybenzaldehyd, Hippursäure und Essigsäureanhydrid tritt zunächst Kondensation zu p-Oxy-α-benzoylamidozimmtsäure ein:



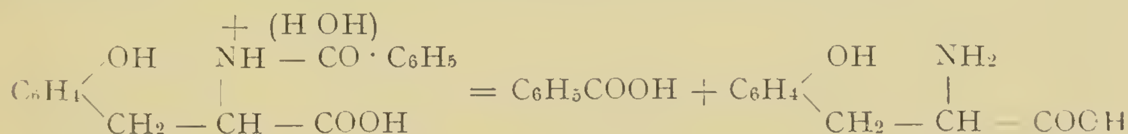
Gleichzeitig wird innermolekular 1 Mol. Wasser abgespalten, und es tritt noch Acetylierung des Phenolhydroxyls ein, so daß als Produkt der Reaktion ein acetylierter Lactimid das erhalten wird.



Durch Erwärmen mit Natronlauge auf dem Wasserbade erfolgt die Aufspaltung des Lactimidringes und die Verseifung der Acetatgruppe ziemlich rasch und zwar zu p-Oxy-α-Benzoylamidozimmtsäure. Diese wird nun durch Natriumamalgam zu dem Benzoyltyrosin reduziert,



welches beim Erhitzen mit konz. Salzsäure im Einschlußrohre auf 150° in Tyrosin und Benzoësäure hydrolytisch gespalten wird.



Das linksdrehende l-Tyrosin hat zuerst E. Fischer[2]) aus dem d-l Benzoyltyrosin durch Darstellung seines Brucinsalzes erhalten; läßt man das letztere auskristallisieren, so erhält man zunächst eine Kristallisation des Brucinsalzes des Benzoyl-l-Tyrosins, während dasjenige des Benzoyl-d-Tyrosins in der Mutterlauge zurückbleibt. Das aus dem Brucin-

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. 307, 138 (1899).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3638 (1899).

salze abgeschiedene Benzoyltyrosin lieferte bei 8stündigem Erhitzen mit 40 Teilen 10%iger Salzsäure im geschlossenen Rohr auf 100° l-Tyrosin.

Eigenschaften. Das natürlich vorkommende und das durch Spaltung der Proteine hervorgehende ist meist l-Tyrosin. l-Tyrosin bildet feine, zu Büscheln vereinigte Kristallnadeln, ist farblos, ohne Geruch und von etwas fadem Geschmacke. Es ist schwer löslich in kaltem Wasser, etwa 1 : 2000, leichter löslich in heißem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol und in Aether. Als Aminosäure löst sich Tyrosin in Alkalilaugen, Ammoniak, Alkalikarbonatlösungen sowie in verdünnten Mineralsäuren, ist aber unlöslich in Essigsäure. Wie die meisten Aminosäuren gibt Tyrosin beim Kochen seiner wässerigen Lösung mit Kupferoxydhydrat, ein Kupferoxydsalz, das in blauen Prismen kristallisierende Tyrosinkupfer $(C_9H_{10}NO_3)_2Cu$. — Es liefert ferner Ester; beim Einleiten von Salzsäure in eine Mischung aus Tyrosin und Aethylalkohol bis zur Lösung und Kochen unter Rückfluß entsteht der in flachen Prismen kristallisierende l-Tyrosinäthylester.

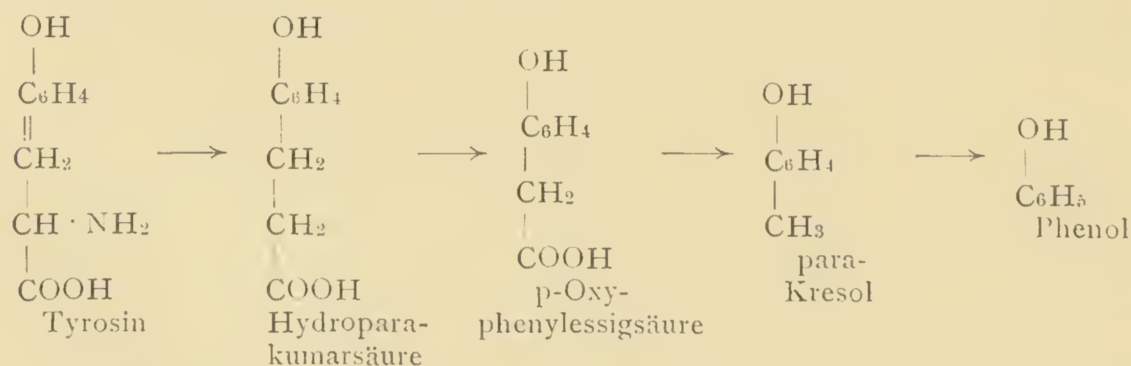
Durch Schütteln von Tyrosin mit Benzoylchlorid und Natriumbikarbonatlösung entsteht Dibenzoyltyrosin $C_6H_5 . CO . O . C_6H_4 . CH_2 . CH(NH . CO . C_6H_5) . COOH$.

Wie andere Aminosäuren (vgl. Glykokoll) läßt sich Tyrosin in ein β-Naphthalinsulfoderivat, nämlich in Di-β-Naphthalinsulfotyrosin $C_{10}H_7 . SO_2 . O . C_6H_4 . CH_2 . CH(NH . SO_2 . C_{10}H_7) . COOH$ überführen, und mit Phenylisocyanat entsteht in alkalischer Lösung Phenylcyanat-Tyrosin $HO . C_6H_4 . CH_2 . CH(NH . CO . NH . C_6H_5) . COOH$.

Vgl. »Allgemeine Eigenschaften der Aminosäuren« S. 236.

In analoger Weise erhält man mit Hilfe von α-Naphtylisocyanat aus einer alkalischen Lösung des Tyrosins das Alkalisalz des α-Naphtylisocyanat-l-Tyrosins $HO . C_6H_4 . CH_2 . CH . (NH . CO . NH . C_{10}H_7) . COOH$, feine, sternförmig gruppierte Nadeln vom Schmp. 205—206°.

Unter dem Einflusse von Fäulnisbakterien geht Tyrosin in Hydroparakumarsäure, in para-Oxyphenylessigsäure und in p-Kresol über; bei Zutritt von Sauerstoff entsteht schließlich aus dem p-Kresol Phenol:



Die gleichen Fäulnisprozesse spielen sich selbstverständlich im Darme ab, und zwar besonders dann, wenn reichlich Tyrosin eingeführt wird, wie dies seinerzeit E. Baumann nachgewiesen hat.

Nachweis des Tyrosins.

Glaubt man aus einem Harnsediment oder Konkrement Tyrosin isoliert zu haben, so kann es durch die folgenden Reaktionen identifiziert werden:

1. Die Millon'sche Probe. Wie alle einwertigen Phenole färbt sich auch eine Lösung von Tyrosin beim Erwärmen mit »Millon« rot, und es scheidet sich unter Umständen nach einiger Zeit ein roter Niederschlag aus.

2. Die Probe von Piria. Erwärmt man trockenes Tyrosin mit wenig konz. Schwefelsäure etwa $^1/_2$ Stunde im Wasserbade, neutralisiert die erkaltete und mit Wasser verdünnte Lösung mit Baryum- oder Calciumkarbonat, filtriert ab, dunstet das Filtrat auf ein kleines Volumen ein und fügt eine Spur Eisenchlorid hinzu, so färbt sich die Flüssigkeit infolge ihres Gehaltes an Tyrosinsulfosäure violett.

3. Die Probe von Carl Th. Mörner[1]). Man mische sich das folgende, bei der Aufbewahrung haltbare Reagens: 1 Volumen Formalin (= ca. 40%ige wässerige Formaldehydlösung) + 45 Vol. Wasser + 55 Vol. konz. Schwefelsäure. — Erhitzt man einige Kubikzentimeter von diesem Reagens mit wenig festem oder gelöstem Tyrosin bis zum Kochen, so färbt sich die Mischung alsbald schön grün. Die Grünfärbung bleibt lange bestehen. — Ein- und mehrwertige Phenole, Homogentisinsäure, Eiweißstoffe, Albumosen und Albumoide geben diese Probe nicht.

4. Die Probe von Denigès ist eine modifizierte Mörner'sche Probe. Bringt man ein wenig Tyrosin zu 2—3 ccm einer Mischung von 1 ccm Formalin und 50 ccm konz. Schwefelsäure, so färbt sich dieses nach kurzer Zeit weinrot. Fügt man jetzt sofort das doppelte Volumen Eisessig hinzu und kocht auf, so färbt sich die Flüssigkeit grün.

Arginin.

Arginin = Guanidin-α-Aminovaleriansäure, $C_6H_{14}N_4O_2$, wurde seinerzeit in den Kotyledonen der Lupinensamen entdeckt, entsteht in den Keimpflanzen auf Kosten der Eiweißsubstanzen, und ist später unter den Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe von Hedin zuerst aufgefunden worden, von den letzteren bildet es einen allgemein vorkommenden Bestandteil. Im Harne ist es bisher nur einmal aufgefunden worden, nämlich bei Phosphorvergiftung (Wohlgemuth)[2]), ebenso im Harn von Kaninchen, die mit Phosphor vergiftet waren.

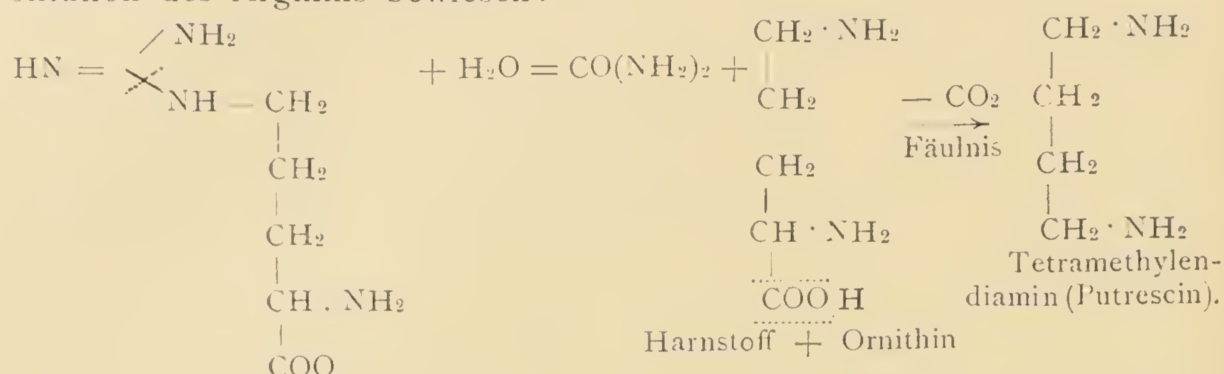
Konstitution und Aufbau. Wird Arginin mit gesättigtem Barytwasser eine Stunde am Rückflußkühler gekocht, so wird es in Harnstoff und Ornithin hydrolytisch gespalten (E. Schulze und A. Likiernik sowie Schulze und Winterstein)[3]). Da die Konsti-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 86 (1902/3).

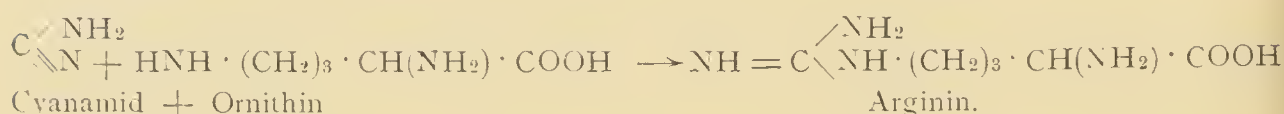
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 74 (1905).

[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 24, 2701 (1891) und Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 1 (1898).

tution des letzteren gegeben ist, besonders durch den Uebergang des Ornithins in Tetramethylendiamin bei der Fäulnis, so ist auch die Konstitution des Arginins bewiesen:



E. Schulze und E. Winterstein[1]) haben das Arginin synthetisch erhalten durch Stehenlassen eines Gemisches der wässerigen Lösungen von freiem Ornithin, Cyanamid und Aetzbaryt während ca. 3 Wochen unter einer Glasglocke über Natronkalk:



Da für die Synthese optisch-aktives Ornithin verwendet wurde, wurde hierbei auch optisch-aktives, nämlich d-Arginin erhalten. Durch Erhitzen einer Lösung von d-Arginin in 50%iger Schwefelsäure unter Druck bei etwa 180° wird es vollständig razemisiert, also in (d + l)-Arginin übergeführt.

Eigenschaften. Das natürlich vorkommende und das durch Hydrolyse der Proteine entstehende ist das rechtsdrehende d-Arginin. d-Arginin kristallisiert aus konzentrierter wässeriger Lösung in rosettenartigen Drusen von rechtwinkligen oder zugespitzten Tafeln und dünnen Prismen, ist in Wasser leicht löslich, in Alkohol fast unlöslich. Die wässerige Lösung schmeckt schwach bitter, reagiert stark alkalisch und zieht Kohlensäure aus der Luft an. Arginin ist gleichzeitig Base und Säure und gibt daher sowohl mit 1 Aeq. Säure wie auch mit manchen Metalloxyden Salze. Argininchlorhydrat $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + H_2O$ kristallisiert aus Wasser, leichter aus heißem verdünntem Alkohol. d-Argininnitrat $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$ kristallistiert aus feinen Nadeln. Ein für Arginin charakteristisches Doppelsalz ist das Argininkupfernitrat $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$, das durch Auflösen von Kupferhydroxyd in der warmen d-Nitratlösung erhalten wird und sich beim Erkalten in blauen Prismen ausscheidet, Schmp. 112—114°. — d-Argininpikrat $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH + 2H_2O$, kristallisiert aus heißem Wasser in Aggregaten langer, seidenglänzender Nadeln von Schmp. 205—206°. — d-Argininpikrolonat $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5 + H_2O$ gelbe, feine Nadeln vom Zersetzungspunkt 225—231°, in Wasser und Alkohol sehr wenig löslich. — Dibenzoylarginin, aus heißem Wasser feine Nadeln vom Schmp. 217—218°, leicht löslich in verdünnter Natronlauge. Kossel und Dakin haben

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 128 (190/1902).

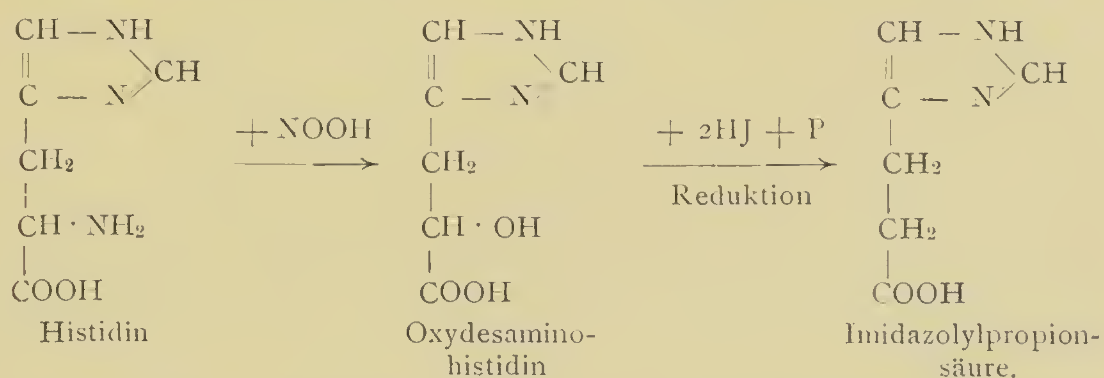
in verschiedenen Organen, besonders aber in der Leber, ein lösliches Ferment aufgefunden, welches auf d-Arginin gerade so einwirkt wie Barytwasser, dasselbe also in Harnstoff und Ornithin spaltet. Wegen dieser Eigenschaft wurde dieses Ferment »Arginase« genannt.

Für den Nachweis des Arginins eignen sich besonders das Argininnitrat, Argininkupfernitrat und Argininpikrolonat.

Histidin.

Histidin, β-Imidazolyl-α-aminopropionsäure, $C_6H_9N_3O_2$, ist nach R. Engeland[1]) ein normaler Bestandteil des Menschenharns, der sich aber nur in sehr geringer Menge im Harn vorfinden dürfte, denn nur bei der Verarbeitung von 40 Liter Harn gelang der Nachweis des Histidins. Histidin wurde zuerst von Kossel[2]) unter den Spaltungsprodukten des Sturins, eines Protamins, entdeckt. Histidin findet sich unter den Spaltungsprodukten der Proteïnstoffe durch Säurespaltung oder bei der tryptischen Verdauung. Herm. Pauly[3]) hat als erster das Histidin als ein Imidazol- oder Glyoxalinderivat erkannt und eine richtige Konstitutionsformel für dasselbe aufgestellt, nachdem S. Fränkel schon vorher nachgewiesen hatte, daß Histidin eine Carboxyl- und eine primäre Aminogruppe enthält. Erst durch die Untersuchungen von F. Knoop und A. Windaus[4]) sowie von F. Knoop[5]) ist der Beweis für die Richtigkeit der Pauly'schen Histidinformel einwandsfrei erbracht worden.

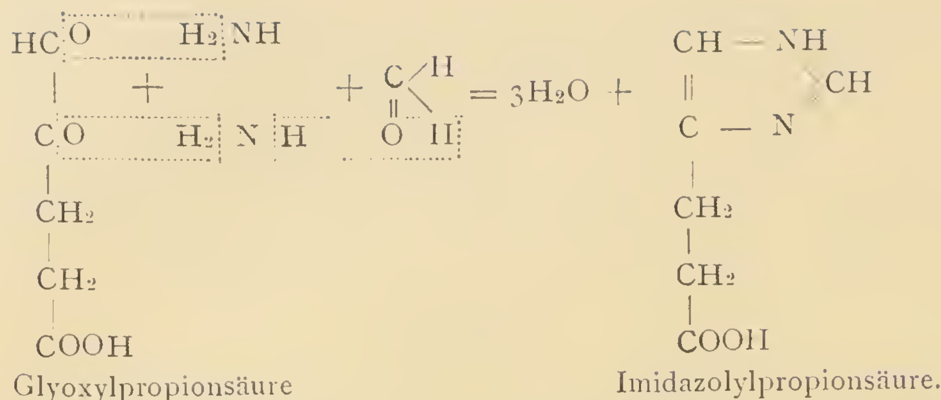
Konstitution. Histidin läßt sich mit salpetriger Säure unter Ersatz der primären Aminogruppe gegen Hydroxyl in Oxydesaminohistidin überführen, welches durch Jodwasserstoff bei Gegenwart von Phosphor zu Imidazolylpropionsäure reduziert wird.



Histidin — Oxydesaminohistidin — Imidazolylpropionsäure.

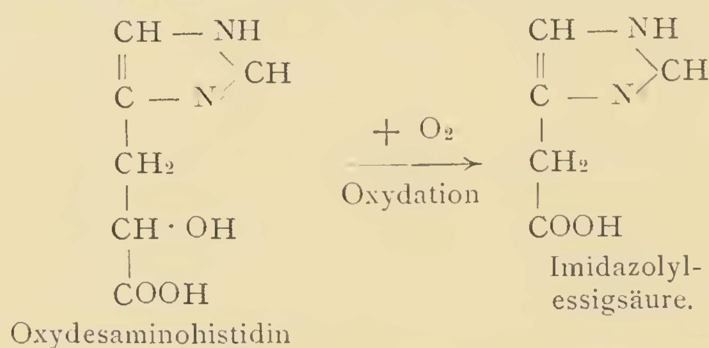
Die letztere ist identisch mit der aus Glyoxylpropionsäure, Ammoniak und Formaldehyd, nach allgemeiner Bildungsweise der Glyoxaline, dargestellten Imidazolylpropionsäure:

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 49 (1908).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 176 (1896/97).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 508 (1904).
[4]) Hofmeisters Beiträge 7, 144 (1905).
[5]) Hofmeisters Beiträge 10, 111 (1907).



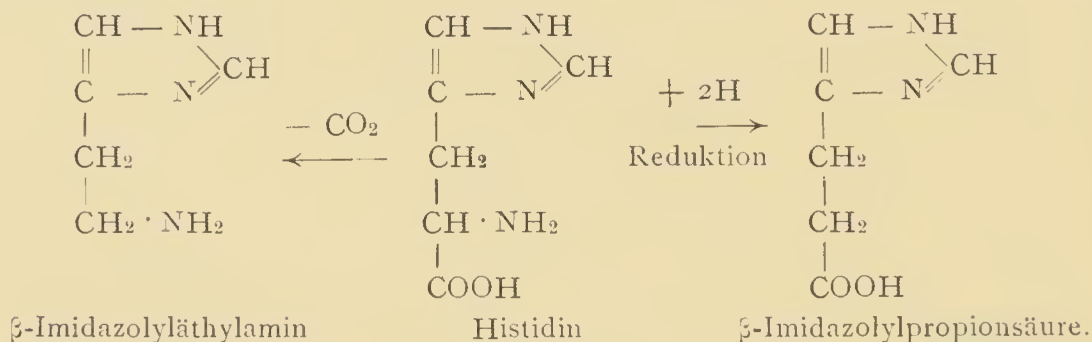
Glyoxylpropionsäure Imidazolylpropionsäure.

Dadurch, daß Knoop das Oxydesaminohistidin mit Baryumpermanganat und Schwefelsäure zu Imidazolylessigsäure oxydieren konnte, ist der Beweis für die α-Stellung der Aminogruppe im Histidinmolekül in einwandsfreier Weise erbracht worden:



Oxydesaminohistidin Imidazolyl-essigsäure.

D. Ackermann[1]) führten seine Versuche zu dem gleichen Schlusse, indem er aus dem Histidin durch Bakterieneinwirkung einerseits β-Imidazolyläthylamin und andererseits β-Imidazolylpropionsäure erhalten hat:



β-Imidazolyläthylamin Histidin β-Imidazolylpropionsäure.

Eigenschaften. Histidin bildet Blättchen, Tafeln oder Nadeln, schmilzt unter starkem Aufschäumen bei 253°, ist sehr leicht löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Aether. Das als Spaltungsprodukt aus den Eiweißstoffen erhältliche Histidin ist linksdrehend; $[\alpha]_D^{20} = -39{,}74^0$ in 3%iger Lösung. Die salzsaure Lösung dreht rechts. Histidinlösungen reagieren stark alkalisch. Als Aminosäure bildet Histidin mit Säuren und mit Basen Salze. Histidinmonochlorhydrat, $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$, kristallisiert aus Wasser in rhombischen, glashellen, dicken Kristallen, die ihr Kristallwasser erst von 140° ab verlieren. — Histidindichlorhydrat, $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl$, entsteht beim Lösen des Monochlorhydrats in wenig

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 504 (1910).

heißer konz. Salzsäure und Ausfällen mit Alkohol-Aether. Die Kristalle können aus fünffach normaler Salzsäure umkristallisiert werden und schmelzen bei 233°. — Histidinpikrolonat, $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2C_{10}H_6N_4O_3$, kristallisiert in hellgelben Nädelchen. Histidin gibt ein Monobenzoylderivat, ein Dinaphthalin-β-sulfohistidin und ein Dipikrylhistidin.

Darstellung des Histidins aus Blut nach F. Knoop.

Man bringt in größere Rundkolben erst konz. Salzsäure, dann in kleinen Mengen Blut, erhitzt auf einem Baboblech und füllt so lange Blut nach, bis 2 Vol. Blut auf 1 Vol. konz. Salzsäure zugegeben sind. Nach 10stündigem Kochen wird der größte Teil der Salzsäure abgedampft, mit Soda bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert und abfiltriert. Das weingelbe Filtrat wird mit Soda deutlich alkalisch gemacht, so lange gekocht, bis die Ammoniakentwicklung beendigt ist, wiederum filtriert und die abfiltrierte Flüssigkeit mit Quecksilberchlorid in der Weise ausgefällt, daß sie während des Ausfällens andauernd sodaalkalisch bleibt. Der Niederschlag wird in möglichst wenig verdünnter Salzsäure gelöst, die abfiltrierte Lösung wieder vorsichtig mit Soda und wenig Quecksilberchlorid bei Gegenwart von viel Wasser gefällt und der jetzt erhaltene abfiltrierte und gut ausgewaschene Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Beim Eindampfen des Filtrats auf ein kleineres Volumen scheidet sich Histidinmonochlorhydrat in farblosen, derben Kristallen ab. Aus 10 Liter Blut werden 70—90 g desselben erhalten.

Nachweis des Histidins.

Bis jetzt ist Histidin nur einmal aus normalem menschlichen Harn erhalten worden (R. Engeland), vgl. dessen Verfahren (l. c.). — Zur Identifizierung des Histidins dienen die folgenden Reaktionen:

1. Versetzt man eine wässerige Histidinlösung mit Kalilauge sowie mit einer Spur Kupfersulfat und erwärmt, so färbt sich das Gemisch zuerst violett und alsdann rot.

2. Diazoreaktion. Man versetzt die auf Histidin zu prüfende Lösung mit überschüssiger Sodalösung und mit 3—5 ccm einer unmittelbar vorher bereiteten Lösung sodaalkalischer Lösung von einigen Centigrammen Diazobenzolsulfosäure. Bei Gegenwart von Histidin tritt jetzt noch bei einer Verdünnung von 1 : 20 000 dunkelkirschrote Färbung auf, bei einer solchen von 1 : 100 000 ist noch eine deutlich blaßrote bemerkbar. Im Unterschiede zum Tyrosin, das sich gegen das Diazoreagens ähnlich verhält, gibt Histidin die Millon'sche Probe nicht. — Nach Engeland ist das Histidin eine von den Substanzen, welche neben den aromatischen Oxysäuren die Diazoreaktion des normalen Harns bedingen.

3. Versetzt man eine wässerige Lösung von Histidin oder einem Histidinsalz mit Bromwasser bis gerade zur bleibenden Gelbfärbung, so wird die Lösung beim Erwärmen farblos, dann aber rötlich bis dunkelweinrot. Schließlich scheiden sich schwarze, amorphe Flocken ab. Diese, von F. Knoop angegebene Histidinprobe tritt noch bei einer Konzentration von 1 : 1000 ein.

Cystin.

C y s t i n , das Disulfid des Cysteins oder der α-Amino-β-Thiomilchsäure, $C_6H_{12}S_2N_2O_4$, findet sich höchst wahrscheinlich in Spuren in jedem normalen Harne vor. In selteneren Fällen, bei der C y s t i n u r i e, kann Cystin in größeren Mengen im Harne vorkommen, und zwar scheidet es sich dann infolge seiner Schwerlöslichkeit in der Harnflüssigkeit häufig als weißes, sandiges Sediment aus, oder es gibt auch zur Bildung von Blasensteinen Anlaß. Es wurde von verschiedenen Seiten die interessante Tatsache festgestellt, daß Cystinurie manchmal bei verschiedenen Mitgliedern von ein und derselben Familie und dann meist chronisch auftritt. Die Cystinmengen, die von Cystinurikern im Verlaufe von 24 Stunden mit dem Harn abgesondert werden, sind größeren Schwankungen unterworfen; sie dürften, auf die Tagesmenge Harn bezogen, 0,2 bis 0,6 g Cystin betragen. Entgegen früheren Anschauungen wird gegenwärtig wohl allgemein angenommen, d a ß d i e C y s t i n u r i e a u f e i n e S t ö r u n g d e s E i w e i ß s t o f f w e c h s e l s z u r ü c k z u f ü h r e n i s t (C. N e u b e r g), also auf einen anormalen Stoffwechsel, bei welchem das Cystin aus zunächst unbekannten Gründen sich dem weiteren Abbau entzieht. Auch andere Eiweißspaltungsstücke werden bei der Cystinurie nicht immer in der üblichen Weise weiter abgebaut und oxydiert, sodaß dann außer Cystin auch andere Aminosäuren wie L e u c i n und T y r o s i n mit dem Harn ausgeschieden werden. Der Eiweißumsatz übt zweifelsohne bei Cystinurie einen Einfluß auf die Cystinausscheidung aus und zwar in dem Sinne, daß bei eiweißarmer Nahrung die absolute Menge an ausgeschiedenem Cystin kleiner ist als bei eiweißreicher Ernährungsweise. — A b d e r h a l d e n hat in einem Falle von Cystinurie Cystin auch in der M i l z in reichlicherer Menge nachgewiesen. K. A. H. M ö r n e r[1]) hat zuerst aus H o r n s u b s t a n z durch Erhitzen mit Salzsäure oder Schwefelsäure, dann in der gleichen Weise aus M e n s c h e n h a a r e n Cystin erhalten; die Menge an gewonnenem Cystin betrug 6,8 bis 13,9%, auf die Trockensubstanz berechnet. B u c h t a l a[2]) hat aus verschiedenen K e r a t i n s u b s t a n z e n die folgenden Cystinmengen erhalten: aus Menschenhaaren 12,98 bis 14,53, Menschennägeln 5,15, Roßhaaren 7,98, Pferdehufen 3,20, Rinderklauen 5,37, Rinderhaaren 7,27, Schweinsborsten 7,22 und aus Schweinsklauen 2,17% Cystin. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen folgt, daß die Menschenhaare bei weitem die größte Menge Cystin liefern, ferner daß beim Menschen und bei den in dieser Richtung untersuchten Tieren aus den Haaren beträchtlich mehr Cystin abgespalten wird als aus den Nägeln oder Klauen und Hufen. — Auch als Produkt der tryptischen F i b r i n v e r d a u u n g wurde Cystin erhalten (K ü l z), ferner aus S e r u m a l b u m i n und überhaupt aus Eiweißstoffen (M ö r n e r, G u s t a v E m b d e n).

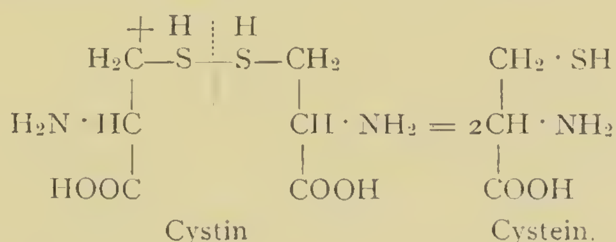
E i g e n s c h a f t e n. Das im Harne, in Harnsedimenten und Kon-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 595 (1899) und ebenda 34, 207 (1901/2).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 474 (1907).

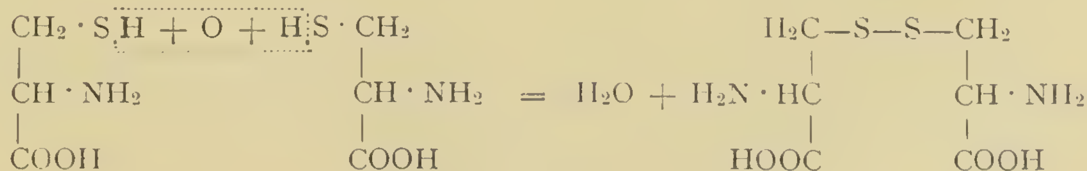
krementen vorkommende Cystin wie auch das aus Keratinsubstanzen und Eiweißstoffen durch Kochen mit Salzsäure oder Schwefelsäure darstellbare Cystin ist das optisch-aktive, linksdrehende Cystin, l-Cystin, das in dünnen, farblosen, sechsseitigen Täfelchen kristallisiert. Beim Eindunsten seiner Lösung in wässeriger Ammoniakflüssigkeit scheidet sich Cystin meist in farblosen Täfelchen mit ungleich langen Seiten aus. Cystin löst sich nicht oder höchstens in Spuren, in Wasser, Alkohol, Aether, Essigsäure, ist aber löslich in den Mineralsäuren, in Oxalsäurelösung, in den wässerigen Alkalilaugen, in Ammoniak, in den Alkalikarbonat- und Alkalibikarbonatlösungen, aber unlöslich in kalter Ammoniumkarbonatlösung. Aus seinen alkalischen Lösungen wird Cystin somit durch Essigsäure und aus seinen mineralsauren Lösungen durch Ammoniumkarbonat wieder unverändert ausgefällt.

Die Lösungen des aus Harn, Sedimenten und Konkrementen isolierten Cystins drehen die Ebene des polarisierten Lichtstrahls nach links und zwar ammoniakalische Lösungen schwächer als salzsaure Lösungen des Cystins. Für eine 2,13%ige Lösung in schwacher Salzsäure fand E. Baumann für $[\alpha]_D = -214^0$, Mörner für Cystin aus Rinderharn -223 bis $-224,3^0$. Beim Erhitzen des linksdrehenden Cystins während 12—15 Stunden mit der 15 bis 20fachen Menge Salzsäure vom sp. Gew. 1,124 wird es zu inaktivem (d + l) Cystin razemisiert. Das letztere bildet tyrosinähnliche Nädelchen, die etwa 3mal leichter von Wasser und Ammoniak gelöst werden als das natürliche l-Cystin. — Kocht man die Lösung des Cystins in überschüssiger Kali- oder Natronlauge mit wenig Bleiacetat, so färbt sie sich zunächst braun, dann schwarz und scheidet allmählich Schwefelblei ab. Die Abspaltung des Schwefels aus dem Cystinmolekül erfolgt also hierbei sehr langsam.

Cystein. Mit naszierendem Wasserstoff, nämlich durch Einwirkung von Zinn und Salzsäure, wird das Disulfid Cystin zu seinem zugehörigen Merkaptan, dem Cystein, reduziert:

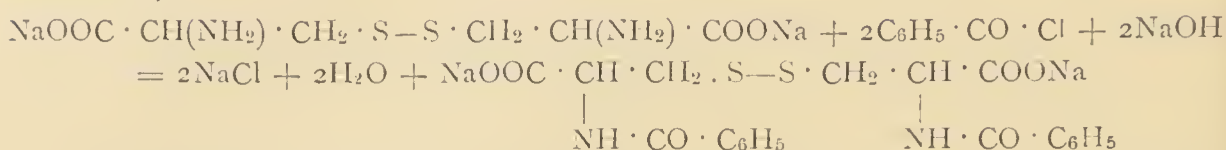


Umgekehrt wird Cystein in salzsaurer Lösung schon durch schwache Oxydationsmittel wie Eisenchlorid zu Cystin oxydiert; in wässeriger Lösung erfolgt diese Oxydation bereits beim Stehenlassen an der Luft.



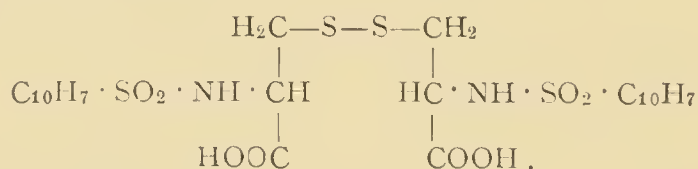
Benzoylcystin. Schüttelt man eine Lösung von Cystin in 10%iger Natronlauge mit Benzoylchlorid, so scheidet sich das Na-

triumsalz des Benzoylcystins als sehr voluminöser aus seidenglänzenden Blättchen bestehender Niederschlag aus (E. Baumann und E. Goldmann)[1].

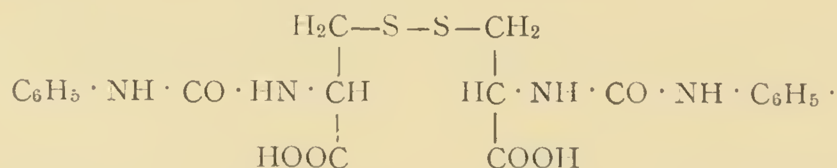

$$NaOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S-S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COONa + 2C_6H_5 \cdot CO \cdot Cl + 2NaOH$$
$$= 2NaCl + 2H_2O + NaOOC \cdot CH(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot CH_2 . S-S \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot COONa$$

Dieses Natriumsalz ist leicht löslich in Wasser, aber fast unlöslich in Natronlauge und scheidet sich daher aus und zwar in Blättchen, wenn man seine wässerige Lösung mit dem doppelten oder dreifachen Volumen Natronlauge versetzt. Aus der verdünnten wässerigen Lösung des Natriumsalzes fällt eine Mineralsäure das freie Benzoylcystin als eine durchscheinende Gallerte aus, die sich beim Stehenlassen oder Erwärmen in dichtere Flocken verwandelt und schließlich aus Alkohol in sehr feinen, biegsamen, zu blumenkohlartigen Massen vereinigten Nadeln vom Schmp. 180—181° kristallisiert.

β-Naphthalinsulfocystin. Man löst Cystin in Ammoniak, fügt $^1/_1$ n-Natronlauge sowie eine ätherische Lösung von β-Naphthalinsulfochlorid $C_{10}H_7 \cdot SO_2 \cdot Cl(\beta)$ hinzu und schüttelt in einer Schüttelmaschine 6 bis 8 Stunden tüchtig durch. Jeweils nach $1^1/_2$ Stunden werden dreimal je 2 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge zugegeben und weiter geschüttelt. Nach Abtrennung der Aetherschicht wird die wässerige Schicht abfiltriert, mit Salzsäure angesäuert und der hierbei ausfallende dickflockige Niederschlag aus heißem absolutem Alkohol umkristallisiert. Man erhält hierbei das β-Naphthalinsulfocystin in flachen Nadeln, die in Wasser und in kaltem absolutem Alkohol schwer löslich sind und bei 215° zu einem braunen Oel zusammenschmelzen. Seine Bildung erfolgt analog derjenigen des Benzoylcystins und seine Konstitution ist selbstverständlich ebenfalls eine ganz analoge:


$$C_{10}H_7 \cdot SO_2 \cdot NH \cdot CH(COOH) \cdot H_2C-S-S-CH_2 \cdot HC(COOH) \cdot NH \cdot SO_2 \cdot C_{10}H_7 .$$

Cystinphenylhydantoinsäure und Cystinphenylhydantoin. Als diprimäres Aminoderivat verbindet sich Cystin mit 2 Mol. Phenylisocyanat, $CO:NC_6H_5$, additionell zu Cystinphenylhydantoinsäure (A. J. Platten)[2].


$$C_6H_5 \cdot NH \cdot CO \cdot HN \cdot CH(HOOC) \cdot H_2C-S-S-CH_2 \cdot HC(COOH) \cdot NH \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5 \cdot$$

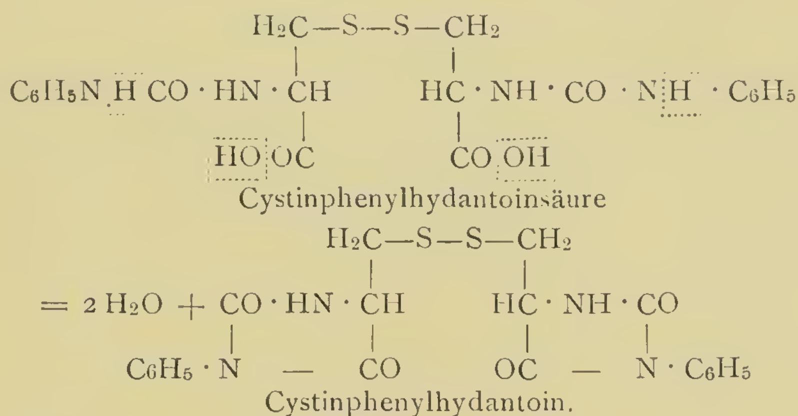
Man schüttelt die Lösung von 1 g Cystin in 12 ccm Wasser + 9 ccm $^1/_1$ n-Alkalilauge anhaltend unter Kühlung mit 1 g Phenylisocyanat[3])

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 254 (1888).

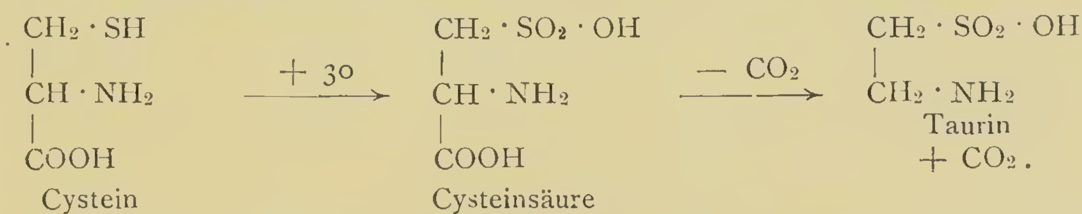
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 350 (1903).

[3]) Phenylisocyanat $C_6H_5N:CO$ bildet eine stark riechende und heftig

bis der stechende Geruch des letzteren verschwunden ist, filtriert dann ab und neutralisiert das Filtrat mit Salzsäure oder säuert es schwach an. Die gebildete Cystinphenylhydantoinsäure fällt in weißen Flocken aus, die am besten aus Aceton umkristallisiert werden. Schmp. 160°. Kocht man die Hydantoinsäure 3 Minuten mit Salzsäure von etwa 10% HCl, so geht sie unter Abspaltung von 2 Mol. Wasser in Cystinphenylhydantoin über, das sich beim Abkühlen in Kristallnadeln abscheidet und aus Alkohol umkristallisiert werden kann. Die Ausbeute an Hydantoin ist nahezu quantitativ. Der Schmelzpunkt des reinen Präparates liegt bei 117°.

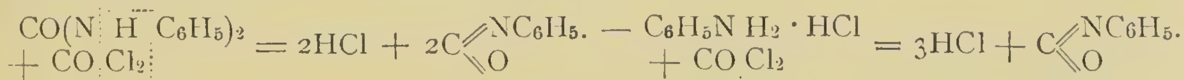


Künstliche Darstellung des Cysteins und Cystins. Die zuerst von E. Baumann für das Cystin aufgestellte Konstitutionsformel $[CH_3 \cdot C(NH_2)(S—) \cdot COOH]_2$ kann nicht mehr in Betracht kommen, nachdem E. Friedmann[1]) nachgewiesen hat, daß sich Cystein mittelst Brom zu Cysteinsäure oxydieren und sich die letztere in Taurin und Kohlendioxyd spalten läßt; nach diesem Verhalten des Cysteins muß sich die Sulfhydrylgruppe (SH) am β-Kohlenstoffatom befinden.



Ferner hat C. Neuberg[2]) durch Oxydation des Cysteins mit Salpetersäure Isäthionsäure, also Oxyäthylsulfosäure, $HO \cdot CH_2—CH_2 \cdot$

zu Tränen reizende Flüssigkeit vom Siedep. 166° bei 769 mm. Es wird dargestellt beim Ueberleiten von Phosgen über geschmolzenes Carbanilid oder einfacher über geschmolzenes salzsaures Anilin:



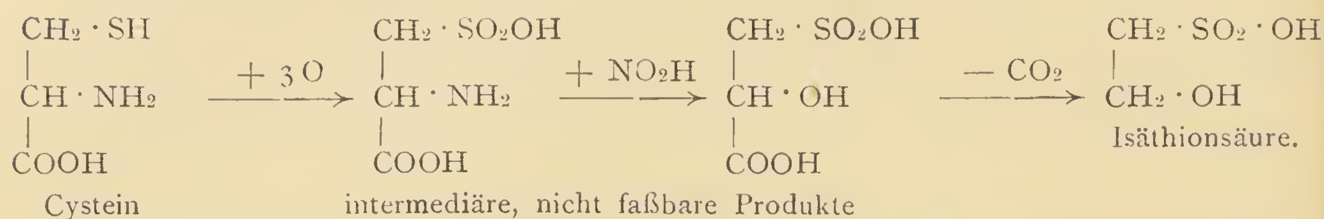
Phenylisocyanat verbindet sich additionell mit Ammoniak, Säureamiden, Aminbasen und Aminosäuren zu substituierten Harnstoffen, z. B. mit Glykokoll:



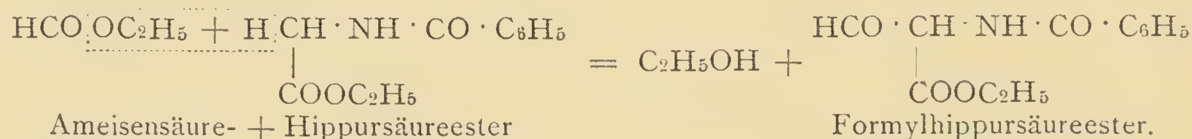
[1]) Hofmeisters Beiträge 3, 1 (1902).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38, 3161 (1902).

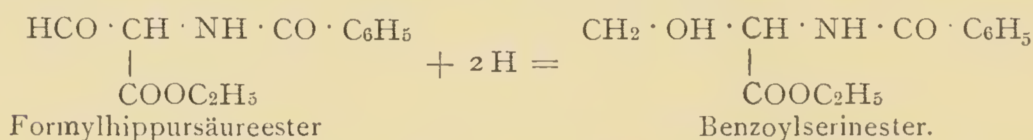
$SO_2 \cdot OH$ erhalten, ein Verhalten, das nur unter der Annahme, daß NH_2 und SH im Cysteinmolekül an zwei verschiedenen Kohlenstoffatomen haften, ungezwungen erklärt werden kann. Man muß hierbei annehmen, daß die Salpetersäure die SH-Gruppe zur Sulfosäure-Gruppe SO_3H oxydiert, daß die dabei auftretende salpetrige Säure dann Amid gegen Hydroxyl ersetzt und daß schließlich Kohlendioxyd abgespalten wird:



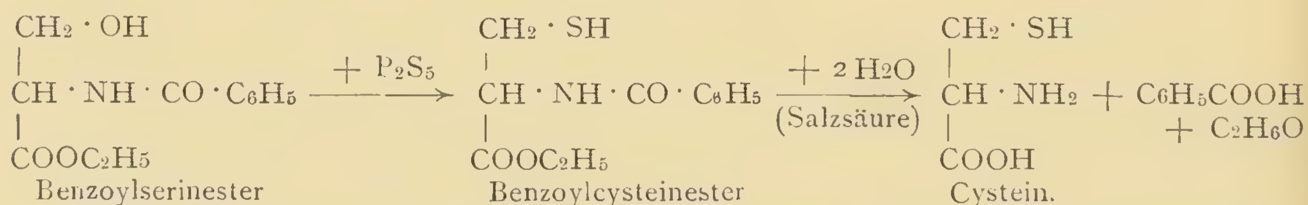
Synthese. Durch die von E. Erlenmeyer[1]) durchgeführte Synthese des Cysteins und somit auch des Cystins ist die Richtigkeit der von Friedmann und von Neuberg für diese Stoffe aufgestellten Formeln bestätigt worden. Ameisensäureester und Hippursäureester lassen sich bei Gegenwart von Natriumäthylat zu Formylhippursäureester kondensieren.



Durch Reduktion des letzteren in feuchter ätherischer Lösung mit Aluminiumamalgam entsteht der Benzoylserinester:



Beim Zusammenschmelzen mit Phosphorpentasulfid geht der Benzoylserinester in Benzoylcysteinester über, der durch Kochen mit Salzsäure unter Rückfluß in Cystein, Benzoësäure und Aethylalkohol hydrolytisch gespalten wird:



Aus der Lösung des so künstlich erhaltenen Cysteins in Ammoniak erhielt E. Erlenmeyer beim Durchleiten von Luft inaktives Cystin, das sich beim Ansäuern mit Essigsäure als ein sandiges, mikrokristallinisches Pulver abgeschieden hat.

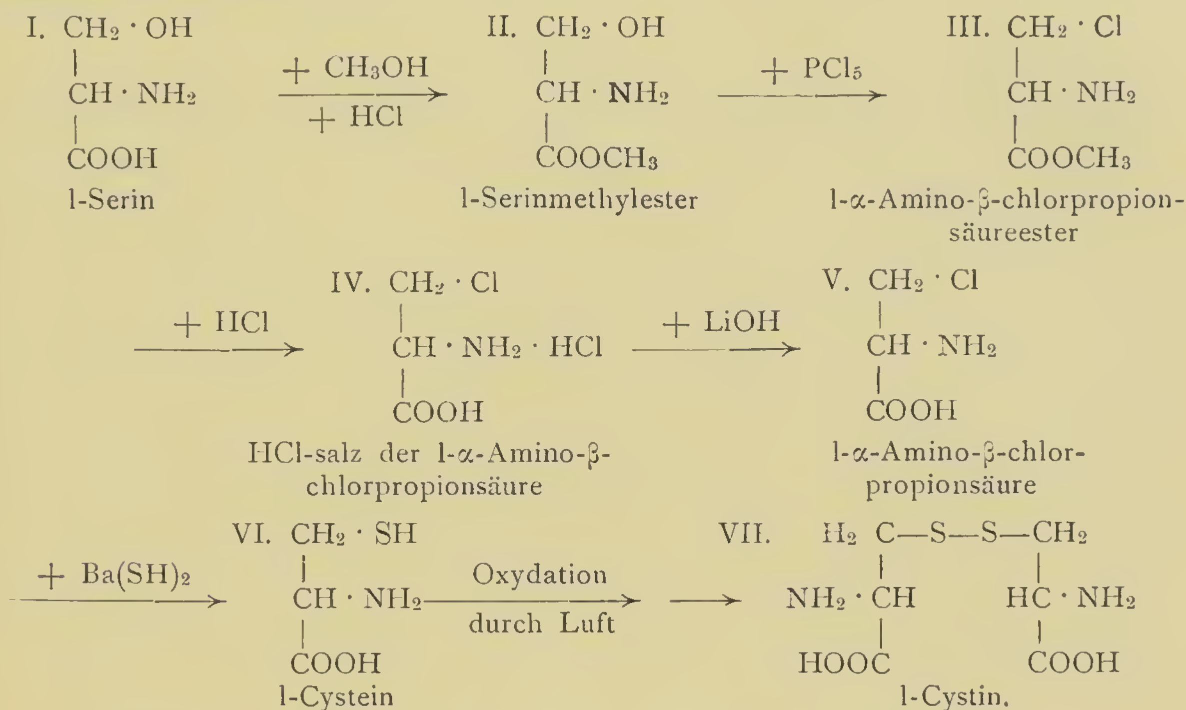
Synthese des l-Cystins nach E. Fischer und K. Raske[2]). l-Serin (I) wird mit Methylalkohol und Salzsäuregas in das salzsaure Salz des Serinmethylesters (II) und dieses mit Phosphorpenta-

---

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 36, 2720 (1903) und Ann. d. Chem. 337, 222 (1905).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 41, 893 (1908).

chlorid in der Kälte in das salzsaure Salz des l-Aminochlorpropionsäuremethylesters (III) übergeführt. Aus diesem Ester wird durch Verseifen der Estergruppe mit Salzsäure von 20% bei 100° das Hydrochlorid der l-α-Amino-β-chlorpropionsäure (IV) und aus diesem mit Hilfe von Lithiumhydroxyd die freie l-α-Amino-β-chlorpropionsäure (V) dargestellt. Wird diese mit Baryumhydrosulfid in wässeriger Lösung 1½ Stunden auf 100° erwärmt, so läßt sich aus der Flüssigkeit, nach Entfernung des überschüssigen Baryumhydrosulfids und unter Zusatz von Ammoniak, durch Einleiten von Luft l-Cystin (VII) isolieren. Intermediär entsteht Cystein (VI).



Nachweis des Cystins in Sedimenten und Konkrementen.

Man bringt das Cystin des betreffenden Sediments oder zerkleinerten Konkrements mit Hilfe von Alkalikarbonatlösung in Lösung, fällt es mit Essigsäure aus, löst es nochmals in möglichst wenig Ammoniakflüssigkeit und läßt diese Lösung an der Luft verdunsten. Das Cystin kristallisiert dann in charakteristischen Blättchen aus. Falls in der Tat Cystin vorliegt, zeigen die erhaltenen Kristalle das folgende Verhalten:

1. Beim Kochen der Kristalle mit Kalilauge und wenig Bleiacetat tritt durch entstandenes Schwefelbei Schwarzfärbung ein, oder es scheidet sich ein schwarzer Niederschlag aus.

2. Kocht man die Lösung der Kristalle in einigen Tropfen Kali- oder Natronlauge auf einem Silberblech, so bildet sich auf diesem ein schwarzer Fleck von Schwefelsilber.

Nachweis des im Harn gelösten Cystins.

Bei Abwesenheit von Eiweiß und Schwefelwasserstoff erkennt man das im Harne gelöste Cystin durch Kochen mit Alkalilauge und Nachweis des gebildeten Schwefelalkalis mit Bleiacetat oder Nitroprus-

sidnatrium. — Zur Abscheidung des gelösten Cystins säuert man eine größere Menge Harn mit Essigsäure stark an, filtriert einen nach 24 Stunden gebildeten Niederschlag ab, erwärmt ihn gelinde mit Salzsäure, wodurch Cystin und Calciumoxalat, nicht aber Harnsäure gelöst werden, filtriert ab und übersättigt das Filtrat mit Ammoniumkarbonat. Zieht man nun den hierbei erhaltenen Niederschlag mit Ammoniak aus, so geht vorhandenes Cystin in Lösung, während Calciumoxalat ungelöst bleibt. Aus der abermals abfiltrierten Lösung fällt dann Essigsäure, bis zur sauren Reaktion hinzugesetzt, reines Cystin aus, das unter dem Mikroskope und mit Hilfe der oben angeführten Reaktionen als solches erkannt wird.

Bestimmung des im Harn gelösten Cystins nach J. F. Gaskell[1]).

Man versetzt eine größere Menge (200 bis 500 ccm) des vorher von etwa vorhandenem Cystinsediment abfiltrierten Harns mit Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion und mit Chlorcalcium im Ueberschusse, um die vorhandenen Phosphate und Oxalate vollständig auszufällen, filtriert in ein Becherglas ab, bringt zum Filtrate samt Waschwasser das gleiche Volumen Aceton und säuert mit Essigsäure gerade an. Nach 3 bis 4tägigem Stehen an einem kühlen Orte werden die ausgeschiedenen Kristalle auf einem Filter gesammelt, mit kaltem Wasser ausgewaschen, dann auf dem Filter in 2,5%igem Ammoniak gelöst. Diese ammoniakalische Lösung wird wieder mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und mit Essigsäure angesäuert. Nach 24stündigem Stehen wird das ausgeschiedene Cystin auf einem gewogenen Filter gesammelt, bei 80° getrocknet und in einem Wägegläschen samt Filter gewogen.

Hippursäure.

Hippursäure, Benzoylglykokoll, Benzoylaminoessigsäure, $C_9H_9NO_3 = C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$, kommt fast immer im Harn des Menschen vor, wenn auch häufig nur in sehr geringer Menge. Bei gemischter Kost beträgt die in 24 Stunden mit dem Harne ausgeschiedene Menge Hippursäure in der Regel weniger als 1 g, im Mittel nur 0,7 g. Nach reichlichem Genusse von Gemüse, namentlich aber von Obst, kann sich ihre Menge auf mehr als 2 g belaufen. Nach innerlicher Darreichung von Benzoësäure und von solchen aromatischen Substanzen, die im Tierkörper zu Benzoësäure verbrannt werden wie von Benzaldehyd, Toluol, Zimmtsäure, Hydrozimmtsäure, ist die Menge der ausgeschiedenen Hippursäure vermehrt, indem die Benzoësäure mit, vom Organismus gelieferten Glykokoll eine Synthese zu Hippursäure eingeht:



$$C_6H_5 \cdot CO\vdots OH + H\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH = H_2O + C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH.$$

Auch nach Einnahme von Chinasäure $C_6H_6(OH)_4COOH$, einer im Pflanzenreiche weit verbreiteten aromatischen Säure, ist die Hippursäure-

---

[1]) Journ. of physiolog. 36, 142 (1907).

ausscheidung vermehrt; hierbei muß die Chinasäure vor der Paarung mit Glykokoll erst zu Benzoësäure reduziert werden.

Da Hippursäure sich auch im Harne hungernder Hunde vorfindet, ebenso, wenn diese Tiere ausschließlich mit Fleisch ernährt werden, so ist, wenigstens für diesen Fall, die Annahme berechtigt, daß die für die Hippursäurebildung nötige Benzoësäure aus dem Eiweiß stammt und von der Eiweißfäulnis im Darme herrührt. Bei der Eiweißfäulnis außerhalb des Körpers entsteht neben vielen anderen Produkten die Phenylpropionsäure, $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$, welche dem Organismus einverleibt zu Benzoësäure oxydiert und, nach der Paarung mit Glykokoll, als Hippursäure ausgeschieden wird.

Daß die Darmfäulnis für die Entstehung der Hippursäure eine größere Bedeutung hat, geht daraus hervor, daß die Hippursäure nach kräftiger Desinfektion des Darmes von Hunden mit Calomel aus dem Harne der betreffenden Tiere verschwindet; Versuche, die seinerzeit E. Baumann ausgeführt hat.

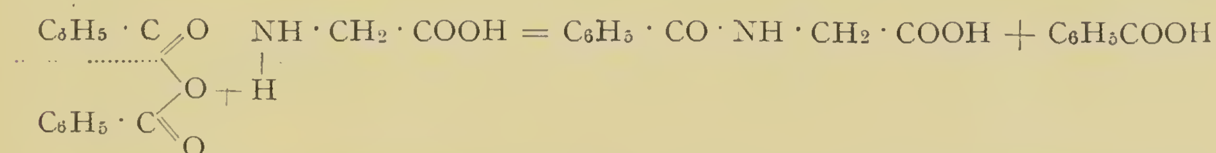
Beim Hunde vollzieht sich die Hippursäurebildung in der Niere. Beim Pflanzenfresser wie beim Kaninchen scheint es, als ob die Bildung der Hippursäure auch in anderen Organen wie in Leber und Muskeln vonstatten ginge. Hippursäure entsteht bei wiederholtem Durchleiten einer Mischung der Lösungen von Glykokoll und benzoësaurem Natrium mit Blut durch eine auspräparierte Hundeniere.

Künstliche Darstellung. 1. Durch Erhitzen von Benzamid mit Monochloressigsäure auf 160°:



$$C_6H_5 \cdot CO . NH\,H + Cl\,CH_2 \cdot COOH = HCl + C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH \cdot$$

2. Durch Erhitzen von Glykokoll mit Benzoësäureanhydrid:



$$C_6H_5 \cdot C\!\!=\!\!O \quad NH \cdot CH_2 \cdot COOH = C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH + C_6H_5COOH$$
$$\rangle O + H$$
$$C_6H_5 \cdot C\!\!=\!\!O$$

3. Durch Zufließenlassen von Benzoylchlorid in eine mit Natronlauge versetzte konzentrierte wässerige Lösung von Glykokoll:



$$C_6H_5 \cdot CO \cdot Cl + H\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH = C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH + HCl.$$

Hierbei entsteht Hippursäure mit fast theoretischer Ausbeute.

Eigenschaften. Hippursäure kristallisiert in langen vierseitigen, rhombischen Säulen und Prismen oder auch in Nadeln, ist löslich in 600 Teilen kaltem Wasser, bedeutend leichter löslich in siedendem Wasser, leicht in Alkohol, ziemlich leicht in Essigäther, schwer in Aether, gar nicht in Benzol und Petroläther löslich (Unterschied von Benzoësäure). Sie schmilzt bei 187,5° und ist mit Wasserdämpfen nicht flüchtig. Hippursäure ist eine ziemlich starke einbasische Säure, die mit Basen meist kristallisierende Salze bildet.

Darstellung aus Pflanzenfresserharn. Man dampft 1 bis 2 l frischen Pferde- oder Rinderharn möglichst rasch auf ein kleineres Volumen ein, läßt

erkalten und rührt 10 bis 20 ccm konz. Salzsäure darunter. Nachdem das Gemisch an einem kühlen Orte, zweckmäßig in einem Eisschranke, 20—24 Stunden gestanden hat, saugt man die auskristallisierte Hippursäure gut ab, wäscht sie mit wenig kaltem Wasser aus und kristallisiert sie aus heißem Wasser unter Zuhilfenahme von Tierkohle wiederholt um. Man kann den aus dem Harne hartnäckig anhaftenden Farbstoff auch in der Weise entfernen, daß man die rohe, noch gefärbte Hippursäure in sehr verdünnter wässeriger Natronlauge löst, die Lösung zum Sieden erhitzt, dann tropfenweise Natriumhypochloritlösung bis zur Entfärbung hinzufügt, erkalten läßt und die Hippursäure schließlich mit Salzsäure wieder ausscheidet. Aus altem, schon gefaultem Pferde- oder Rinderharn erhält man keine Hippursäure mehr, wohl aber Benzoësäure. Hippursäure wird nämlich beim Kochen mit konz. Salzsäure oder starker Alkalilauge in Glykokoll und Benzoësäure hydrolytisch gespalten. Die gleiche Spaltung vollzieht sich beim Stehenlassen und Faulen hippursäurehaltigen Harns wie auch nach Zusatz von faulenden Massen zu wässerigen Lösungen von hippursauren Salzen:



$$C_6H_5 \cdot CO.NH \cdot CH_2 \cdot COOH = C_6H_5 \cdot COOH + H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH .$$
$$+ (HO.H)$$

Nachweis und quantitative Bestimmung der Hippursäure im Harn.

Nach Bunge und Schmiedeberg[1]). Man versetzt 500 ccm und mehr Harn mit Natriumkarbonat bis zur schwach alkalischen Reaktion, dampft auf dem Wasserbade fast zur Trockne ein, durchrührt den Rückstand wiederholt mit neuen Mengen kaltem absolutem Alkohol, filtriert ab, verdunstet das Filtrat auf dem Wasserbade, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf, säuert mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt mindestens 5mal mit Essigäther tüchtig aus.

Die vereinigten Essigätherauszüge werden mit wenig Wasser gewaschen, dann bei mäßiger Temperatur eingedunstet. Den eingetrockneten Rückstand zieht man mit Petroläther aus, welcher Benzoësäure, Oxysäuren, Phenole und etwa vorhandenes Fett löst, während die Hippursäure ungelöst zurückbleibt. Den hierbei bleibenden Rückstand löst man in wenig heißem Wasser, fügt etwas Tierkohle hinzu und verdunstet dann das Filtrat bei einer 50—60^0 nicht übersteigenden Temperatur zur Kristallisation. Die ausgeschiedenen Hippursäurekristalle werden auf einem gewogenen Filter gesammelt. Um die in der abfiltrierten Mutterlauge noch gelöste Hippursäure zu gewinnen, schüttelt man sie wiederholt mit kleineren Mengen Essigäther aus, verdunstet die Essigätherauszüge und bringt den Verdunstungsrückstand zu den Kristallen auf dem Filter. Dieses wird schließlich im Vacuum über Schwefelsäure oder bei 100^0 getrocknet und gewogen.

Zum qualitativen Nachweis der Hippursäure benutzt man das charakteristische Löslichkeitsverhalten, den Schmelzpunkt (187,5^0), die Kristallform sowie die Spaltbarkeit in Glykokoll und Benzoësäure beim Kochen mit konz. Salzsäure während 1 Stunde. Nach dem Erkalten entzieht man dem Reaktionsprodukt mit wenig Aether die gebildete Benzoësäure und charakterisiert die letztere in dem Verdunstungsrück-

[1]) Archiv f. exp. Pathol. und Pharm. 6, 233 (1877).

stande der Aetherlösung durch den Schmelzpunkt (120—121°), die leichte Sublimationsfähigkeit und die Kristallform.

Die quantitativen Bestimmungsmethoden des Aminosäurestickstoffs im Harn.

Von den verschiedenen Methoden, welche in der letzten Zeit für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn empfohlen wurden, können nur zwei oder drei als quantitative Bestimmungsmethoden gelten, nämlich die Bestimmung des Aminosäurestickstoffs nach Glässner und die Formoltitration nach Sörensen-Henriques.

1. Die Bestimmung nach Glässner[1]).

Fällt man Harn mit Phosphorwolframsäure aus, so finden sich von stickstoffhaltigen Substanzen im Filtrate noch Harnstoff und die Monoaminosäuren vor. Dampft man alsdann dieses Filtrat zur Trockne ein, so läßt sich dem Trockenrückstande mit Hilfe eines Aethylalkohol-Amylalkoholgemisches der Harnstoff vollständig entziehen, während die von Glässner untersuchten Monoaminosäuren Glykokoll, Alanin, Leucin und Asparaginsäure ungelöst bleiben; nur von Tyrosin geht eine Spur in das Alkoholgemisch über.

Erfordernisse. 1. Eine Mischung aus 100 g Phosphorwolframsäure Merck, 100 ccm Salzsäure vom spez. Gew. 1, 124 und 800 ccm Wasser.

2. Eine Mischung aus gleichen Volumen wasserfreiem Aethyl- und Amylalkohol.

Ausführung. Man fällt 20 ccm Harn mit der Phosphorwolframsäuremischung vorsichtig vollständig aus, läßt 24 Stunden kalt stehen, filtriert ab und dunstet das Filtrat in einer flachen Schale im Vacuum über Schwefelsäure ein. Den erhaltenen Rückstand trocknet man in einem Wärmekasten (Luftbad) bei 50° gänzlich aus, pulverisiert ihn, bringt ihn mit Hilfe der Alkoholmischung in ein mit Steigrohr versehenes Kölbchen, in dem sich 50 ccm der Alkohol-Amylalkoholmischung befinden. Nun wird das Kölbchen 6 Stunden auf dem kochenden Wasserbade erhitzt, die Flüssigkeit heiß abfiltriert und das Filter mit heißer Alkoholmischung nachgewaschen. Von dem auf dem Filter befindlichen Rückstand wird der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Man koche den Rückstand samt Filter mit 10 ccm konz. Schwefelsäure 0,5 g Kupfersulfat + 10 g Kaliumsulfat. Um heftiges Stoßen zu vermeiden, erhitze man zu Beginn nur mit ganz kleiner Flamme.

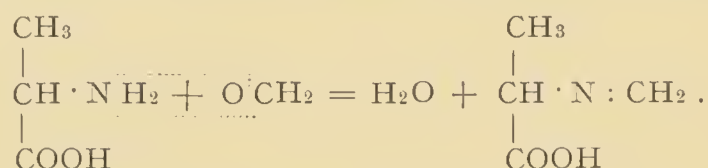
2. Die Bestimmung durch Formoltitration nach Sörensen-Henriques[2]).

Obwohl die Konstitutionsformeln der Proteïnstoffe noch durchaus unbekannt sind, ist zweifelsohne ein sehr wichtiger, ja wahrscheinlich

[1]) Zeitschr. f. experiment. Path. 4, 336 (1908).

[2]) Biochemische Zeitschrift 7, 45 (1907), 21, 175, 22, 355 (1909). Ferner Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 1 (1909), 63, 27 (1909), 64, 120 (1910).

weitaus der wesentlichste Teil des Proteïnmoleküls aus Aminosäuren aufgebaut, indem diese durch Anhydridbildung zwischen *Carboxyl*- und *Aminogruppen* mit einander verknüpft sind: *Peptidbildungen*. Die proteolytischen Spaltungen bestehen im wesentlichen in einer Auflösung solcher Peptidbindungen und Bildung von *Carboxyl*- und *Aminogruppen*. Es hat sich gezeigt, daß es möglich ist, nach Zusatz von *Formol*, welches die primäre Aminogruppe bindet und Methylenverbindungen bildet, die Menge der Carboxylgruppen vor und nach der proteolytischen Spaltung *titrimetrisch* zu bestimmen. Der Zuwachs der Carboxylgruppenacidität repräsentiert die Ausdehnung der Proteolyse. Diese Betrachtungsweise haben *Sörensen* und *Henriques* auf die Aminosäuren übertragen. Läßt man z. B. Formaldehyd auf Alanin einwirken, so vollzieht sich die folgende chemische Umsetzung:



In diesen Formaldehydkondensationsprodukten der Aminosäuren läßt sich die durch die vorhandenen Carboxylgruppen bedingte Acidität titrimetrisch bestimmen. Da sich aber auch *Ammoniak* mit Formaldehyd kondensiert — Bildung von Hexamethylentetramin —, so muß gleichzeitig mit der Formoltitrierung eine Ammoniakbestimmung ausgeführt werden. — V. *Henriques* und S. P. L. *Sörensen*[1]) geben für die Bestimmung der Aminosäuren und Polypeptide im Harn die folgende Vorschrift:

In einen 100 ccm Meßkolben werden 50 ccm Harn abpipettiert, mit 1 ccm Phenolphtaleïnlösung (0,5 g Phenolphtaleïn in 50 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser gelöst) und mit 2 g festem Baryumchlorid versetzt. Nach dem Umschütteln, bis das letztere gelöst ist, wird eine gesättigte Lösung von Aetzbaryt bis zur roten Farbe und darauf noch weitere 5 ccm zugesetzt, worauf der Kolben bis zur Marke gefüllt wird. Nach gutem Umschütteln wird der Kolben 15 Minuten stehen gelassen, worauf man durch ein trockenes Filter gießt. 80 ccm des klaren roten Filtrats (= 40 ccm ursprünglicher Harn) werden in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht, worauf diese Flüssigkeit mit $^{1}/_{5}$ n-Salzsäure, unter Anwendung von *sehr empfindlichem* Lackmuspapier als Indikator, neutralisiert und alsdann mit ausgekochtem und wieder erkaltetem, also *kohlensäurefreiem*, Wasser bis auf 100 ccm verdünnt wird. In gleich großen Teilen der neutralisierten Flüssigkeit z. B. in je 40 ccm (= 16 ccm ursprünglicher Harn) bestimmt man teils das Ammoniak, teils die formoltitrierbare Stickstoffmenge.

I. Die *Ammoniakbestimmung* wird durch Destillation im Vacuum nach *Krüger-Reich* ausgeführt. Das in 40 ccm der neu-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 132 (1910).

tralisierten Flüssigkeit (= 16 ccm Harn) gefundene Ammoniak wird direkt auf Stickstoff umgerechnet. 1 ccm $^1/_5$ n-Säure = 2,8 mgr. N.

II. Für die Formoltitrierung vermischt man 40 ccm der neutralisierten Flüssigkeit (= 16 ccm Harn) mit 10 ccm der Formolmischung[1]) und gleich darauf mit $^1/_5$ n-Natronlauge bis zur Rotfärbung und dann noch mit ein Paar ccm $^1/_5$ n-Lauge, um etwa noch vorhandene Karbonate oder Phosphate zu fällen. Dann wird mit $^1/_5$ n-Salzsäure zurücktitriert, bis die Farbe der Lösung schwächer als die der Kontrollösung erscheint (s. unten); schließlich wird $^1/_5$ n-Lauge zugetröpfelt, bis die Farbe der Kontrollösung (II. Stadium) erreicht ist. Die Titration wird vollendet durch Zusatz der $^1/_5$ n-Lauge bis zur Erreichung des III. Stadiums.

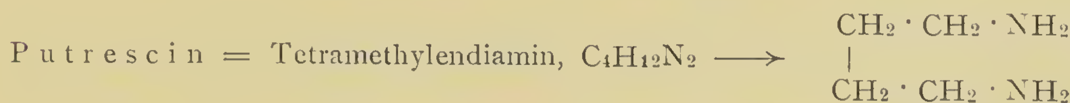
Kontrollösung. Zum Vergleiche ist für die Formoltitration die folgende Kontrollösung notwendig: Man setzt zu 20 ccm ausgekochtem Wasser 10 ccm obiger Formolmischung und darnach 5 ccm $^1/_5$ n-Natronlauge oder $^1/_5$ n-Barytlösung und titriert mit $^1/_5$ n-Salzsäure zurück, indem man unter Schütteln zutropft, bis die Flüssigkeit einen schwach rosa Farbenton annimmt (I. Stadium), dann setzt man noch einen Tropfen der Lauge hinzu, wodurch eine deutliche rote Färbung entsteht (II. Stadium). Auf Zusatz von zwei weiteren Tropfen der $^1/_5$ n-Lauge entsteht starke Rotfärbung (III. Stadium).

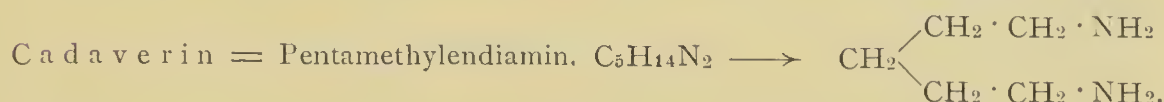
Berechnung. Multipliziert man die bei der Formoltitrierung verbrauchte Menge ccm $^1/_5$ n-Lauge mit 2,8, so erfährt man in mgr die gesamte Stickstoffmenge, welche in 16 ccm Harn als Ammoniak- und als Aminosäurenstickstoff vorhanden ist. Zieht man von dieser Gesamtstickstoffmenge die durch die Ammoniakbestimmung gefundene Stickstoffmenge ab, so gibt die Differenz die Menge des Aminosäurenstickstoffs in Milligrammen von 16 ccm Harn an.

Bemerkungen. Nach Henriques und Sörensen müssen sowohl Aminosäuren wie auch Polypeptide als normale Bestandteile des Menschenharns angesehen werden.

Diamine.

Putrescin und Cadaverin.


Putrescin = Tetramethylendiamin, $C_4H_{12}N_2$ ⟶ $CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$ | $CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$


Cadaverin = Pentamethylendiamin, $C_5H_{14}N_2$ ⟶ $CH_2\langle^{CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2}_{CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2}$.

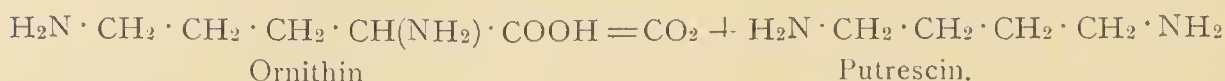
Diese beiden Basen wurden zuerst von Brieger aus gefaultem Fleisch erhalten. Nach Versuchen von A. Ellinger[2]) entsteht Putrescin bei der Fäulnis von Ornithin mit Pankreas und in analoger Weise

---

[1]) Formolmischung = 50 ccm ca. 40%ige Formaldehydlösung + 1 ccm 0,5%ige Phenolphtaleïnlösung + $^1/_5$ n-Natronlauge oder $^1/_5$ n-Barytlauge bis zur ganz schwachen, gerade bemerkbaren Rotfärbung.

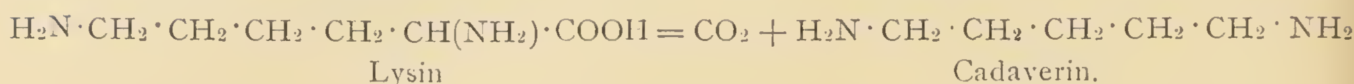
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 334 (1900).

das Cadaverin aus Lysin oder Diaminocapronsäure; in beiden Fällen wird unter dem Einflusse der Fäulnisbakterien Kohlendioxyd abgespaltet:



$$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH = CO_2 + H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$$

Ornithin Putrescin.

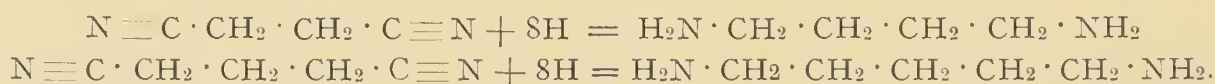


$$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH = CO_2 + H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$$

Lysin Cadaverin.

Beide Diamine haben E. Baumann und L. v. Udránszky[1]) aus dem Harn und den Faeces eines an Cystinurie leidenden Mannes darstellen können; aber die beiden Basen finden sich nicht immer im Harn und in Faeces der Cystinuriker vor. Bemerkenswert ist eine von Loewy und Neuberg[2]) gemachte Beobachtung, wonach bei einem Cystinuriker verabreichtes Arginin in Putrescin und Lysin in Cadaverin überging.

Synthesen. A. Ladenburg[3]) hat durch Reduktion des Aethylencyanids mit naszierendem Wasserstoff — Natrium in Verbindung mit Alkohol — das Tetramethylendiamin und in analoger Weise aus Trimethylencyanid das Pentamethylendiamin erhalten:

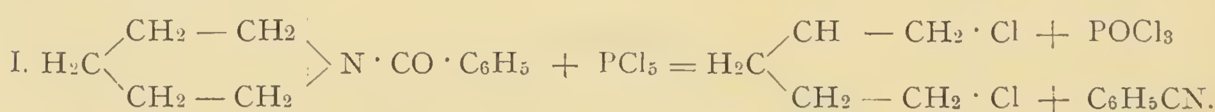


$$N \equiv C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot C \equiv N + 8H = H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$$

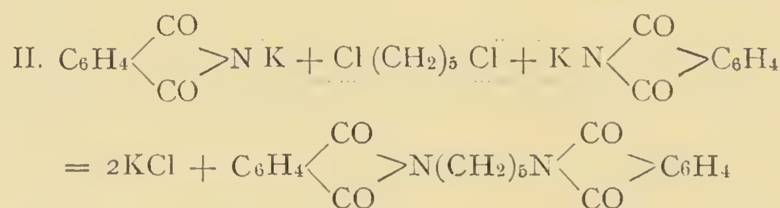
$$N \equiv C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot C \equiv N + 8H = H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2.$$

In gleicher Weise geht das sogenannte Pyrrolhydroxylamin nach der Ladenburg'schen Reduktionsmethode in Tetramethylendiamin über.

J. von Braun[4]) hat einen Weg gefunden, auf dem man vom Piperidin leicht zum Cadaverin gelangen kann. Das Benzoylpiperidin wird durch Fünffach-Chlorphosphor aufgespalten (I) und das hierbei entstehende 1,5-Dichlorpentan mit Phtalimidkalium in das Pentamethylen-diphtalimid verwandelt (II), das mit konz. Salzsäure unter Druck bei 200⁰ glatt in Phtalsäure und salzsaures Pentamethylendiamin gespalten wird:

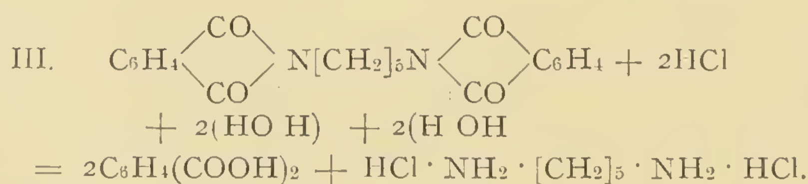


$$\text{I. } H_2C\begin{cases}CH_2 - CH_2\\CH_2 - CH_2\end{cases}\!\!> N \cdot CO \cdot C_6H_5 + PCl_5 = H_2C\begin{cases}CH - CH_2 \cdot Cl + POCl_3\\CH_2 - CH_2 \cdot Cl + C_6H_5CN.\end{cases}$$



$$\text{II. } C_6H_4\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> NK + Cl(CH_2)_5Cl + KN\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> C_6H_4$$

$$= 2KCl + C_6H_4\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> N(CH_2)_5N\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> C_6H_4$$



$$\text{III. } C_6H_4\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> N[CH_2]_5N\begin{cases}CO\\CO\end{cases}\!\!> C_6H_4 + 2HCl$$

$$+ 2(HO\,H) + 2(H\,OH)$$

$$= 2C_6H_4(COOH)_2 + HCl \cdot NH_2 \cdot [CH_2]_5 \cdot NH_2 \cdot HCl.$$

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 562 (1889).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 338 (1904/5).

[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 19, 780 (1886).

[4]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 37, 3583 (1904).

Darstellung von Putrescin und Cadaverin aus Harn und Faeces.

1. *Nach E. Baumann und v. Udránszky* (l. c.). 1500 ccm Harn werden mit 200 ccm 10%iger Natronlauge und 20—25 ccm Benzoylchlorid tüchtig geschüttelt, bis der Geruch des letzteren verschwunden ist. Der größte Teil der gebildeten Benzoylderivate der beiden Diamine scheidet sich ab, ein kleinerer Teil derselben bleibt in Lösung. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit Alkohol ausgezogen, der filtrierte eingeengte alkoholische Auszug in die etwa 30fache Menge Wasser gegossen, die sich allmählich abscheidende Kristallisation abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und abermals in Alkohol gelöst. Aus der wiederum mit Wasser verdünnten Lösung scheiden sich die Gemenge der beiden Benzoylverbindungen ab.

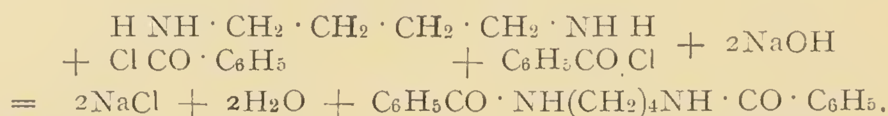
Die von dem *zuerst* erhaltenen Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit, welche noch einen kleineren Teil der Benzoylverbindungen enthält, wird zur Gewinnung der letzteren mit Schwefelsäure stark angesäuert, dann mit Aether wiederholt ausgeschüttelt, der beim Abdestillieren des Aethers bleibende Rückstand alsbald mit überschüssiger Natronlauge versetzt und zur Kristallisation in Eis (Eisschrank) gestellt. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit kaltem Wasser gewaschen, in wenig warmem Alkohol gelöst, aus dieser Lösung durch Zusatz von viel Wasser wieder abgeschieden und mit den erst erhaltenen Kristallen (= Hauptmenge) vereinigt. Das so erhaltene *Gemenge* von *Dibenzoylputrescin* und *Dibenzoylcàdaverin* wird in der zur Lösung gerade erforderlichen Menge *warmen* Alkohols gelöst und diese Lösung in das 20fache Volumen Aether gegossen; beim Stehenlassen dieses Gemisches kristallisiert die Putrescinverbindung aus, während die Càdaverinverbindung gelöst bleibt.

2. *Nach A. Loewy und C. Neuberg* [1]. Der vom ausgefallenen Cystin abfiltrierte Harn wird mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der abfiltrierte Niederschlag mit Wasser ausgewaschen und mit Aetzbaryt zerlegt. Nach Entfernung des Barytüberschusses durch Kohlensäure resultiert eine optisch inaktive, stark alkalische Lösung, die mit Natronlauge und tropfenweise mit *Phenylcyanat*, $CO:NC_6H_5$, versetzt wird. Jeder einfallende Tropfen des letzteren hat unter deutlicher Erwärmung die sofortige Ausscheidung eines voluminösen Niederschlags zur Folge. Man läßt so lange das Cyanat zutropfen, als noch ein Niederschlag entsteht. Der abfiltrierte Niederschlag, der aus den Phenylcyanatverbindungen des Putrescins und Cadaverins besteht, wird mit Alkohol ausgekocht, erst getrocknet, dann in Pyridin zu einer kalt *gesättigten* Lösung gelöst und mit wasserfreiem Aceton versetzt; hierbei fällt sofort das Tetramethylenderivat aus, während das Pentamethylenderivat erst bei mehrstündigem Stehen aus dem Filtrate sich abscheinet. Beide Fraktionen können durch nochmaliges Umkristallisieren gereinigt werden. Reines *Phenylcyanat-tetramethylendiamin* schmilzt bei 240°, reines *Phenylcyanat-pentamethylendiamin* bei 207—209°. Beide Verbindungen sind unlöslich in Wasser, kaltem Alkohol, Aether, Aceton, Benzol, Essigäther und Ligroin. Sie sind löslich in heißem Nitrobenzol, Anilin und namentlich in warmem Pyridin. Aus letzterem oder einem Gemisch von Pyridin mit Aceton kristallisieren sie in zu Büscheln vereinigten Nadeln.

Putrescin, $C_4H_{12}N_{21}$, schmilzt bei 24°, destilliert zwischen 158—160°, ist mit Wasserdämpfen nur wenig flüchtig, löst sich leicht in Wasser und Alkohol, während es in absolutem Aether nur wenig löslich ist. Putrescin ist eine starke, zweiwertige, diprimäre Base, die ein

5) Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 338 (1904/5).

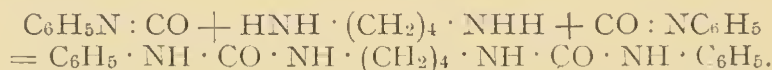
in Alkohol schwer lösliches salzsaures Salz bildet: $(CH_2)_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$. Das in kaltem Wasser schwer lösliche Chloroplatinat $[(CH_2)_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4]$ kristallisiert aus Wasser in feinen Prismen. Die meisten allgemeinen Alkaloidreagentien geben mit der wässerigen Lösung des salzsauren Putrescins krystallinische Niederschläge, nämlich Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium, Jodjodkalium, Pikrinsäure, Pikrolonsäure. — Das Dibenzoylputrescin $C_4H_8(NH \cdot CO \cdot C_6H_5)_2$, dargestellt durch Benzoylieren nach Schotten-Baumann, bildet lange, bei 175—176^0 schmelzende, in Wasser unlösliche, in Alkohol lösliche Kristallnadeln, die aus der alkoholischen Lösung durch überschüssigen Aether gefällt werden:



$$\begin{matrix} H\,NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH\,H \\ +\ Cl\,CO \cdot C_6H_5 \qquad\qquad +\ C_6H_5CO\,Cl \end{matrix} + 2NaOH$$

$$= 2NaCl + 2H_2O + C_6H_5CO \cdot NH(CH_2)_4NH \cdot CO \cdot C_6H_5.$$

Das Phenylcyanatputrescin — Eigenschaften s. oben — entsteht durch additionelle Anlagerung von 2 Mol. Phenylcyanat an 1 Mol. Putrescin:



$$C_6H_5N : CO + HNH \cdot (CH_2)_4 \cdot NHH + CO : NC_6H_5$$
$$= C_6H_5 \cdot NH \cdot CO \cdot NH \cdot (CH_2)_4 \cdot NH \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5.$$

Cadaverin, $C_5H_{14}N_2$, bildet einen farblosen, nicht kristallisierenden, nach Sperma riechenden Syrup, der aus der Luft Kohlensäure anzieht, bei 175—178^0 siedet, mit Wasserdämpfen flüchtig ist und sich leicht in Wasser und Alkohol, aber nur wenig in Aether löst. Das Chloroplatinat, $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$, kristallisiert aus Wasser in Prismen oder Nadeln.

Dibenzoylcadaverin, $C_5H_{10}(NH \cdot CO \cdot C_6H_5)_2$, erhältlich nach Schotten-Baumann, schmilzt bei 130^0, ist unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, aber aus dieser Lösung durch Aether nicht fällbar. (Unterschied von Dibenzoylputrescin.)

Rhodanwasserstoffsäure.

Rhodanwasserstoffsäure, auch Thiocyansäure oder Schwefelcyansäure genannt, CNSH, ist ein Bestandteil des Sekrets der Parotis und Submaxillardrüse sehr vieler Menschen. Nach Untersuchungen von E. Pollacci ist die Rhodanwasserstoffsäure im tierischen Organismus weit verbreitet und von ihm nachgewiesen worden im Speichel, im Magensaft, im Pepsin, im Blut, in der Leber, im Gehirn und Rückenmark, in der Milch und im Harn. Der Gehalt der Körperflüssigkeiten an Rhodanverbindungen ist aber meist sehr gering.

Von den Salzen der Rhodanwasserstoffsäure sind die wichtigsten das Kaliumrhodanid $CN \cdot SK$ und das Ammoniumrhodanid $CN \cdot SNH_4$, zwei kristallisierende, in Wasser und in Alkohol leicht lösliche Salze. Das erstere der beiden Salze entsteht durch Zusammenschmelzen von Cyankalium mit Schwefel $CNK + S = CNSK$ und das Ammoniumrhodanid analog durch Erwärmen von Cyanammoniumlösung mit

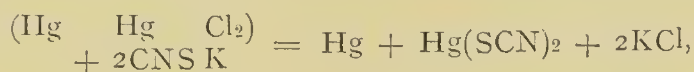
Schwefel oder aber durch Erwärmen von Schwefelkohlenstoff mit alkoholischen Ammoniak:



Die freie Rhodanwasserstoffsäure erhält man durch Destillation ihres Kaliumsalzes mit verdünnter Schwefelsäure oder durch Zerlegung ihres Quecksilbersalzes mit trockenem Schwefelwasserstoff. Sie ist eine stehend riechende Flüssigkeit, die nur bei niederen Temperaturen existiert, denn aus der Kältemischung herausgenommen, polymerisiert sie sich zu einem gelben, amorphen Körper. Die freie Säure löst sich leicht in Wasser und in Alkohol und ist eine sehr starke, einbasische Säure, deren Lösungen stark sauer reagieren. Mit Eisenchlorid gibt die freie Rhodanwasserstoffsäure und ihre Salze eine intensiv blutrote Färbung, die durch Salzsäure nicht verschwindet. Durch Wasserstoff in statu naszendi wird Rhodanwasserstoffsäure zu Cyanwasserstoff und Schwefelwasserstoff reduziert:



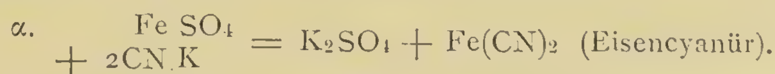
Freie Rhodanwasserstoffsäure und ihre Salze scheiden schon in der Kälte aus Quecksilberchlorür metallisches Quecksilber ab:



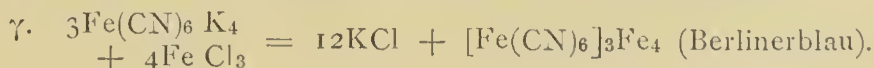
eine Reaktion, die man in vielen Fällen zum Nachweise der Rhodanwasserstoffsäure mit Vorteil anwenden kann.

Nachweis der Rhodanwasserstoffsäure im Harne.

Nach Munk säuert man 200 ccm Harn oder mehr mit verdünnter Salpetersäure an, fällt mit Silbernitrat vollständig aus, filtriert den aus Chlorsilber und Rhodansilber (CNSAg) bestehenden Niederschlag ab, wäscht ihn aus und zerlegt ihn, unter Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff; die vom ausgeschiedenen Schwefelsilber abfiltrierte Flüssigkeit unterwirft man der Destillation und prüft das Destillat mit Hilfe der Berlinerblaureaktion auf Blausäure. Hat nämlich der aus dem Harn mit Silbernitrat erhaltene Niederschlag Rhodansilber enthalten, so findet sich im Destillate Blausäure vor. Zum Nachweise dieser macht man das Destillat mit Kalilauge alkalisch, fügt erst einige Tropfen Ferrosulfat-, dann Eisenchloridlösung hinzu und säuert schließlich mit Salzsäure an; bei Vorhandensein von Blausäure im Destillate scheidet sich Berlinerblau aus; sind nur Spuren von Blausäure zugegen, so färbt sich das Gemisch zunächst blaugrün und erst bei mehrstündigem Stehen scheiden sich blaue Flocken ab. Erklärung der Probe:

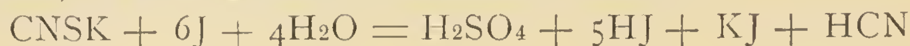






Quantitative Bestimmung der Rhodanwasserstoffsäure im Harn.

Alkalirhodanid tritt bei Gegenwart von Natriumbicarbonat mit Jod im Sinne der folgenden Gleichung in Reaktion: $CNSK + 8 J + 4H_2O = H_2SO_4 + 6HJ + KJ + CNJ$. Da nach dem Ansäuern mit Salzsäure Jodcyan mit Jodwasserstoff nach $CNJ + JH = J_2 + CNH$ reagiert und somit 2 J wieder frei werden, so ist also der Endzustand durch die folgende, in zwei Phasen verlaufende Reaktion



$$CNSK + 6J + 4H_2O = H_2SO_4 + 5HJ + KJ + HCN$$

bedingt.

Bestimmung nach E. Rupp[1]). 100 ccm klar filtrierter Harn werden mit ca. 2 ccm verdünnter Salpetersäure stark angesäuert und mit einem Ueberschusse einer $3^0/_0$igen Silbernitratlösung versetzt; es sind hierzu etwa 100 ccm der letzteren nötig. Nachdem sich der Niederschlag unter Erwärmen auf dem Wasserbade gut abgesetzt hat und auf Vollständigkeit der Fällung geprüft worden ist, saugt man den Niederschlag gut ab, wäscht ihn mit salpeterhaltigem Wasser aus und bringt ihn mit dem Filter und wenig Wasser in eine etwa 1 Liter fassende Glasstöpselflasche. Nun fügt man 3 g oder mehr Natriumbikarbonat, nämlich bis zur alkalischen Reaktion, ferner zur Ueberführung des Chlorsilbers in Jodsilber 3 g Jodkalium hinzu, löst durch sanftes Umschwenken die beiden Salze, verteilt Niederschlag samt Filter mittels Glasstab möglichst fein und läßt nun $^1/_{10}$ n-Jodlösung aus einer Bürette in abgemessener Menge so lange zufließen, bis die Flüssigkeit deutlich braun gefärbt bleibt, wozu im allgemeinen 20 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung ausreichend sind. Nach 4stündigem Stehen der gut verschlossenen Flasche in einem dunklen Raume säuert man mit $10^0/_0$iger Salzsäure vorsichtig an, fügt Stärkelösung hinzu und titriert das überschüssige, also nicht gebundene Jod, mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung zurück.

Berechnung. Nach der obigen Endzustandsgleichung entsprechen 6 Atome Jod einem Molekül Kaliumrhodanid; 1 Atom Jod entspricht somit $^1/_6$ Molekül CNSK und 1000 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung zeigen $^1/_6 \frac{CNSK}{10}$ g $= {^1/_6} \frac{97}{10} = 1{,}62$ g CNSK (abgerundet) an. Oder 1 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung $= 0{,}00162$ g CNSK.

Beispiel. Beim Zurückmessen der überschüssigen $^1/_{10}$ n-Jodlösung wurden 13,8 ccm $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung verbraucht. $20 - 13{,}8 = 6{,}2$ ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung wurden somit vom Rhodansilber des Silberniederschlags gebunden. 100 ccm des untersuchten Harns haben demnach $6{,}2 \times 0{,}00162 = 0{,}010044$ g und 1500 ccm (= Tagesmenge Harn) haben 0,1506 g CNSK enthalten.

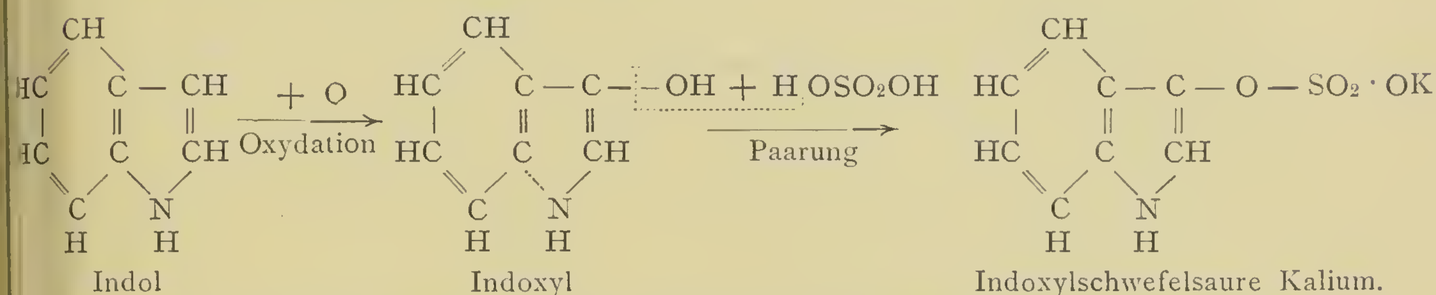
In 1500 ccm Menschenharn sind nach Munk ungefähr 0,165 g CNSK enthalten. Im günstigsten Fall macht der Schwefel des Rhodankaliums $^1/_3$ des »neutralen Schwefels« des Harns aus.

---

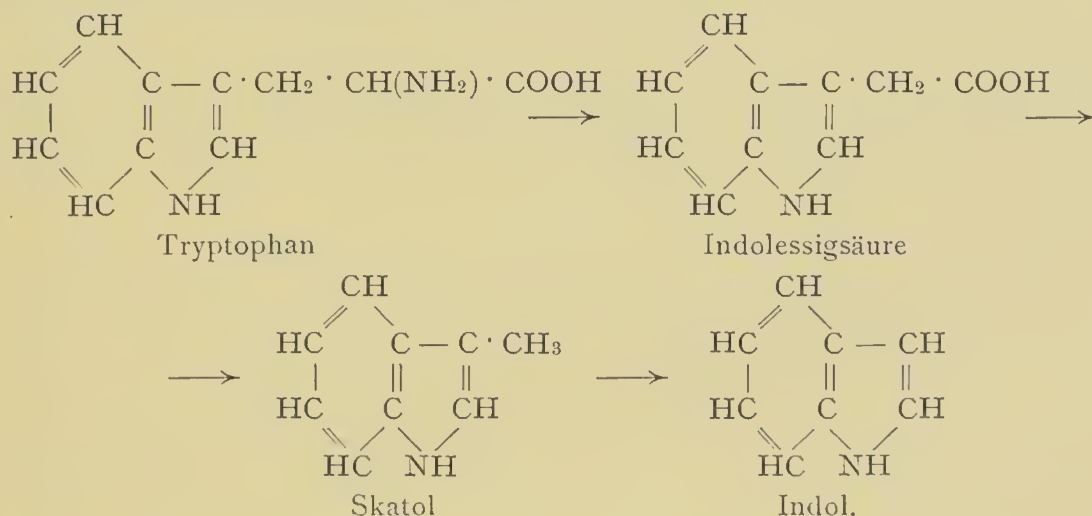
[1]) E. Rupp und E. Schiedt, Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2191 (1902). Für den Harn bearbeitet von A. Edinger und Clemens, Zeitschr. f. klinische Medizin 59, 218 (1906).

Harnindikan.

Harnindikan oder indoxylschwefelsaures Kalium, $C_8H_7NSO_4$, kommt fast in jedem Menschenharne vor, manchmal freilich nur in Spuren. In reichlicherer Menge findet es sich im Harn der Pflanzenfresser, besonders im Pferdeharn. Die Tagesmenge Menschenharn enthält 5—20 mg Indikan. Das Harnindikan stammt aus dem bei der Fäulnis im Darme entstehenden Indol, das nach vorausgegangener Oxydation zu Indoxyl sich mit Schwefelsäure zu Indoxylschwefelsäure und nebenbei mit Glukuronsäure paart, die als Kaliumsalze mit dem Harn ausgeschieden werden.



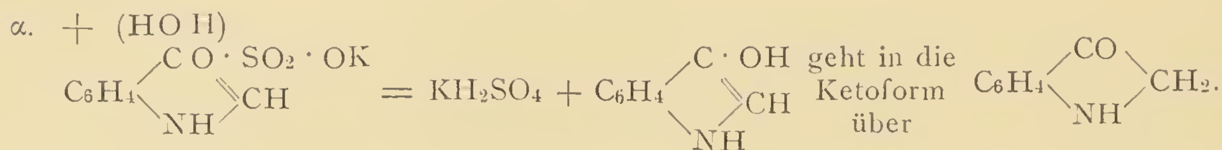
Das Indol entsteht allem Anscheine nach beim Abbau der Eiweißstoffe im Tierkörper, und zwar aus dem Tryptophan oder der Indolaminopropionsäure als Zwischenstufe bei der Fäulnis im Darme. In der Tat liefert Tryptophan bei aerober Fäulnis, also bei Fäulnis unter Luftzutritt, Indolessigsäure, Skatol und Indol:

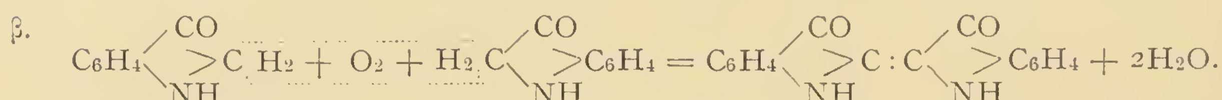


Mit dieser Anschauung stimmt die schon längst beobachtete Tatsache überein, daß die Indikanausscheidung in der Regel bei solchen Krankheiten stark vermehrt ist, bei welchen infolge lebhafterer Darmfäulnis eine reichlichere Menge Indol im Darme gebildet wird. Auch die in anderen Organen und in den Geweben des Körpers bei Krankheiten vorkommenden Fäulnisprozesse können eine Vermehrung des Indikangehaltes des Harns bewirken. Die Indikanausscheidung ist stark vermehrt, wenn Hunden Indol verfüttert oder injiziert wird (Baumann, Brieger), ebenso wenn diese Tiere Orthonitrophenylpropiolsäure $NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot C \vdots C \cdot COOH$ erhalten (G. Hoppe-Seyler). Die letztere indigoliefernde Substanz ist für Hunde ein starkes Gift, während sie auf Kaninchen

kaum giftig wirkt, indem diese Tiere tägliche Dosen von 2—3 g vertragen, ohne daß ernstlichere Vergiftungserscheinungen auftreten.

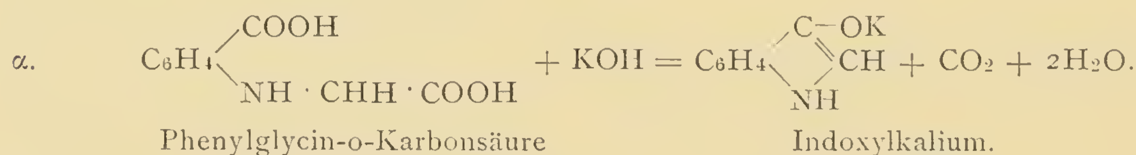
Eigenschaften. Indoxylschwefelsaures Kalium oder Harnindikan kristallisiert aus Alkohol in farblosen, glänzenden Blättchen, die in Wasser leicht, in kaltem Alkohol weniger leicht löslich sind. Von Mineralsäuren wird es zu Indoxyl und saurem schwefelsaurem Kalium hydrolytisch zerlegt (α). Führt man die Hydrolyse des Harnindikans bei Gegenwart von Eisenchlorid, von Chlorkalk oder einem anderen nicht zu kräftig wirkenden Oxydationsmittel aus, so wird das Indoxyl sofort zu Indigo oxydiert (β):

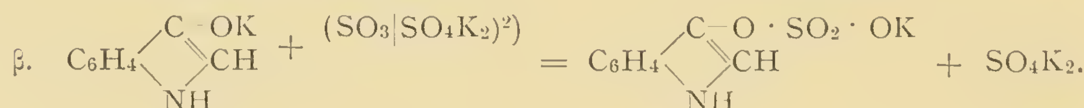




Auf diesen Reaktionen beruht der Nachweis und die quantitative Bestimmung des Harnindikans.

E. Baumann und J. E. Thesen[1]) haben das indoxylschwefelsaure Kalium synthetisch erhalten, indem sie Phenylglyzin-o-Karbonsäure (10 g) in einer silbernen Schale mit Aetzkali (25 g) und einigen ccm Wasser schmolzen und die Schmelze ca. 15 Minuten bei einer Temperatur von 260—270⁰ gehalten haben. Die erkaltete Schmelze, welche nun Indoxylkalium enthält, wird in möglichst wenig siedendem Wasser gelöst und zu dieser Lösung unter häufigem Umschütteln 20 g reinstes Kaliumpyrosulfat ($S_2O_7K_2$) gebracht, während die Temperatur allmählich auf ca. 40⁰ gebracht wird:





Nachweis des Indikans im Harn.

Die Spaltung der aus ihrem Kaliumsalze zunächst frei gemachten Indoxylschwefelsäure wird bei allen Proben mit konzentrierter Salzsäure ausgeführt, die Oxydation des abgespaltenen Indoxyls zu Indigo kann mit Chlorkalklösung (Jaffé), mit Eisenchlorid (Obermayer) oder mit Kupfersulfat (Salkowski) vorgenommen werden. Aber auch andere Oxydationsmittel wie chlorsaures Kalium, Kaliumperman-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 23 (1897).

[2]) Für $S_2O_7K_2$ kann geschrieben werden ($SO_3 \cdot SO_4K_2$).

ganat, Kaliumdichromat und Wasserstoffsuperoxyd sind schon verwendet worden.

Nach Obermayer. Man versetzt 30 ccm des sauer reagierenden Harns[1]) mit ca. 3 ccm Bleiessig, schüttelt um, filtriert ab, bringt 20 ccm des klaren Filtrats in ein größeres Reagensglas oder einen Schüttelzylinder, fügt 2—3 ccm Chloroform sowie 20 ccm Obermayersches Reagens (= Lösung von 3—4 g Eisenchlorid in 1 Liter reiner konzentrierter Salzsäure vom spez. Gew. 1,19) hinzu und schüttelt tüchtig durch. Je nach dem Indikangehalt des untersuchten Harns färbt sich das Chloroform hierbei mehr oder weniger intensiv blau.

Bemerkungen. Die Oxydation des Indoxyls zu Indigo mit dem Obermayer'schen Reagens verläuft nicht quantitativ, denn es wird, infolge Ueberoxydation, immer eine gewisse Menge Isatin gebildet (A. Ellinger[2]).

Verluste an Indikan entstehen bei der Fällung mit Bleiessig ebensowenig wie bei der mit Bleizucker, so lange der Harn sauer reagiert. Harne, welche nicht sauer reagieren, müssen daher vor der Bleiessigfällung mit Essigsäure schwach angesäuert werden.

Quantitative Bestimmung des Indikans im Harn.

Die von verschiedenen Seiten für die Bestimmung des Harnindikans empfohlenen Methoden beruhen darauf, daß man das Indikan in Indigo (Indigoblau) oder in Indigorot überführt und diese entweder mit Hilfe einer eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert oder kolorimetrisch bestimmt.

Zur Zeit dürfte die von A. Ellinger[2]) genauer beschriebene und von T. Imabuchi[3]) modifizierte Titriermethode diejenige Methode sein, welche die am meisten befriedigenden Werte liefert.

1. Titriermethode.

Erfordernisse. 1. Bleiessig. 2. Kupfersulfatlösung (1 : 10). 3. Reines Chloroform. 4. Reine konzentrierte Schwefelsäure, welche Kaliumpermanganatlösung nicht entfärbt. 5. Eine etwa $^1/_{400}$ n-Kaliumpermanganatlösung, welche auf reines Indigoblau zu stellen ist. Für jedesmaligen Gebrauch verdünnt man 5 ccm einer Stammlösung, welche 3 g Kaliumpermanganat in 1 l Wasser enthält, mit Wasser auf 200 ccm.

Nach Imabuchi hat das Kupfersulfat vor dem Eisenchlorid (Obermayer's Reagens) die folgenden Vorzüge: 1. Kupfersulfat liefert etwas mehr Indigo als Eisenchlorid, wahrscheinlich weil die Ueberoxydation zu Isatin nicht so groß ist. 2. Durch Benutzung von Kupfersulfat kommt ein, nur für einen speziellen Fall gebrauchtes Reagens, Obermayer's Reagens, in Fortfall. 3. Ein Ueberschuß von Kupfersulfat schadet weniger als ein solcher von Eisenchlorid. 4. Beim Gebrauche von Kupfersulfat kann man die Ausschüttelung der Harnfiltratreagensmischung mit Chloroform wenigstens 10 Minuten verschieben, während bei Anwendung von Eisenchlorid immer sofort ausgeschüttelt werden muß.

---

[1]) Ein neutraler oder alkalisch reagierender Harn ist vorher mit verdünnter Essigsäure schwach anzusäuern.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 178 (1903).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 502 (1909).

Ausführung nach Imabuchi. Der sauer reagierende oder nötigenfalls vorher mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn wird mit $^1/_{10}$ seines Volumens Bleiessig, Liquor Plumbi subacetici der Apotheke, gefällt, dann durch ein trockenes Filter gegossen. Man versetzt 50 ccm des Harnfiltrats in einem Schütteltrichter mit 1—2 ccm der Kupfersulfatlösung (10%ig) und 50 ccm konzentrierter Salzsäure (D. 1,19), schüttelt um, läßt 5—10 Minuten stehen und schüttelt nun mit Chloroform wiederholt aus. Zuerst nimmt man 50 ccm Chloroform, dann jedesmal nur 20 ccm. 3—4 Ausschüttelungen bei jeweiligem 2 Minuten langem Schütteln genügen in der Regel, um allen Indigo in das Chloroform überzuführen. Man hat also diese Ausschüttelungen so oft zu wiederholen, bis sich auf erneuten Zusatz von Chloroform dieses nicht mehr färbt. Die abgelassenen und vereinigten Indigo-Chloroformlösungen läßt man in einer trockenen Kochflasche oder einem trockenen Schütteltrichter ca. $^1/_4$ Stunde stehen, gießt sie dann durch ein trockenes Filter und destilliert aus ihnen auf dem Wasserbade das Chloroform ab.

Der bleibende Rückstand wird auf dem Wasserbade im liegenden offenen Kolben noch etwa 5 Minuten lang getrocknet, dann mit heißem Wasser 3—4mal in der Weise ausgewaschen, daß man ca. 30 ccm heißes Wasser der Wand entlang eingießt, einige Minuten stehen läßt und wieder abgießt; das Auswaschen muß so oft wiederholt werden, bis das letzte Waschwasser Kaliumpermanganatlösung nicht mehr entfärbt. Eine Loslösung von den, fest an der Glaswand anhaftenden Indigopartikelchen kommt nicht vor. Der so gereinigte Indigorückstand wird nach dem Abgießen des letzten Waschwassers mit 10 ccm reiner konzentrierten Schwefelsäure aufgenommen und zur vollständigen Lösung 5 bis 10 Minuten lang auf dem kochenden Wasserbade erwärmt. Die Schwefelsäurelösung wird nach dem Erkalten in einen sorgfältig gereinigten Erlenmeyerkolben gegossen, in welchem sich etwa 100 ccm destilliertes Wasser befinden, und mit destilliertem Wasser in den »Erlenmeyer« nachgespült. Zu der heißen blauen Lösung läßt man aus einer Bürette von der auf Indigorein gestellten Kaliumpermanganatlösung so lange zufließen, bis der rötliche Farbenton in reines Gelb umschlägt.

Nach Wang ist die Titration beendigt, wenn die grüne Farbe gerade verschwunden ist. Die Flüssigkeit zeigt sich dann gelblich bis fast farblos, aber nicht rot. Glaubt man, daß der gelbliche Farbenton erreicht ist, so liest man die verbrauchte Anzahl ccm der Permanganatlösung ab und läßt dann noch weitere 2 bis 4 Tröpfchen der Permanganatlösung zufließen. Aendert sich die gelbliche Farbennüance nicht mehr, so war Endreaktion da! Andernfalls muß man in dieser Weise fortfahren, indem man jeweils 2 Tropfen Kaliumpermanganatlösung zufließen läßt und beobachtet, ob hierdurch eine Veränderung der Farbennüance eintritt oder nicht. Nach der gegebenen Vorschrift titriert man den Indigo aus 45 ccm ursprünglichem Harn.

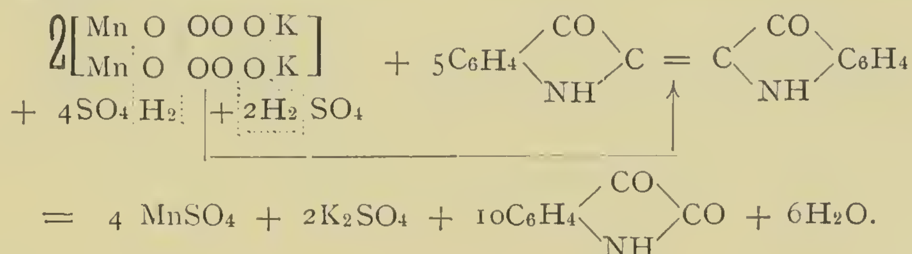
Bemerkungen. Der Titer der Kaliumpermanganatlösung, von welcher 1 ccm ca. 0,00015 g Indigo entspricht, muß mit reinsten Indigo, der in kon-

zentrierter Schwefelsäure zu lösen ist, eingestellt werden. Die Umrechnung des Wertes aus einer Titration mit $^1/_{10}$ n-Oxalsäure genügt nach A. Ellinger[1]) nicht.

Beispiele. I. Mit Obermayers Reagens. 500 ccm Harn + 50 ccm Bleiessig; vom Filtrat verbrauchten die mit »Obermayer« behandelten 50 ccm 3,5 ccm der $KMnO_4$-lösung; auf 50 ccm des ursprünglichen Harns kommen somit 3,5 + 0,35 = 3,75 ccm $KMnO_4$-lösung = 0,635 mg Indigo.

II. Mit Kupfersulfat nach Imabuchi. 50 ccm Harn-Bleiessigfiltrat + 1 ccm $CuSO_4$-lösung + Salzsäure, verbrauchten 3,6 ccm der $KMnO_4$-lösung = 0,649 mg Indigo = 2% Indigo mehr als beim Arbeiten mit Obermayer's Reagens.

Indigo wird durch das Kaliumpermanganat bei Gegenwart von Schwefelsäure zu Isatin oxydiert, ein Vorgang, der im Sinne der folgenden Gleichung nahezu quantitativ verläuft.



Chondroitinschwefelsäure.

Das im Knorpel vorhandene Mukoid, Chondromukoid genannt, erhält man nach C. Th. Mörner, wenn man zerkleinerten Knorpel mit Wasser von 40° auszieht, zu der abfiltrierten Flüssigkeit Salzsäure bis zu 0,2—0,4% hinzufügt und auf dem Wasserbade erwärmt. Chondromukoid scheidet sich hierbei als weißer, flockiger Niederschlag aus; durch nochmaliges Lösen in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Alkalilauge und Wiederausfällen mit Salzsäure oder Essigsäure kann es gereinigt werden. Wie alle Mukoide gehört auch Chondromukoid zu den Glukoproteiden, die als Verbindungen von Eiweißstoffen mit einem Kohlehydrat oder einem Kohlehydratderivat anzusehen sind. Nach dem Kochen mit Säuren reduzieren sie, infolge der abgespaltenen Kohlehydratgruppe, beim Erwärmen die Fehling'sche Lösung. Der Paarling, welcher im Molekül des Chondromukoids mit dem Eiweiß verbunden ist, ist die Chondroitinschwefelsäure; durch Einwirkung von Alkalien wird Chondromukoid in Chondroitinschwefelsäure und Alkalialbuminat hydrolytisch gespalten.

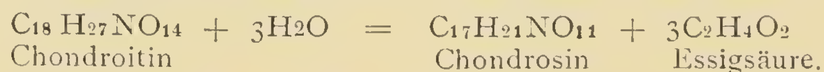
Chondroitinschwefelsäure findet sich in allen Knorpeln vor; sie ist ferner nach K. Mörner ein normaler Bestandteil des menschlichen Harns, und zwar gehört sie zu den eiweißfällenden Substanzen des Harns. Von Mörner wurde Chondroitinschwefelsäure regelmäßig etwa zu 0,05% im Urin gefunden.

Eigenschaften. Die freie Chondroitinschwefelsäure $C_{18}H_{27}NSO_{17}$ ist ihrer Zersetzlichkeit wegen nicht isolierbar; ihr Kupfersalz bildet ein blau-

[1]) Ellinger (l. c) benutzte für die Titerstellung der Kaliumpermanganatlösung »Indigorein« der Badischen Anilin- und Sodafabrik in Ludwigshafen am Rhein.

grünes Pulver, das in Wasser leicht löslich ist. Die wässerige Lösung der Chondroitinschwefelsäure wird durch basisches Bleiacetat und Mercuronitrat gefällt, nicht aber durch Mineralsäuren, Essigsäure, Gerbsäure und Pikrinsäure. Charakteristisch ist das folgende Verhalten der Chondroitinschwefelsäure: Bringt man Lösungen, welche gleichzeitig chondroitinschwefelsaures Alkali und Eiweiß oder Leim enthalten, mit Essigsäure oder Salzsäure zusammen, so entsteht ein Niederschlag von mukoidartiger Substanz (?). Der mit Essigsäure entstandene Niederschlag ist im Ueberschusse des Fällungsmittels unlöslich, nicht aber der durch Mineralsäure hervorgerufene. Kocht man Chondroitinschwefelsäure mit Salzsäure, so wird sie gespalten; die Lösung gibt dann mit Baryumchlorid einen Niederschlag von Baryumsulfat, ferner reduziert sie eine alkalische Kupferoxydlösung. Das erstere Verhalten charakterisiert die Chondroitinschwefelsaure als Aetherschwefelsäure; die oben angegebene Summenformel kann daher aufgelöst werden zu $C_{18}H_{26}NO_{13} - O \cdot SO_2 \cdot OH$.

Die Konstitution der stickstoffhaltigen Spaltungsstücke der Chondroitinschwefelsäure, nämlich des Chondroitins $C_{18}H_{27}NO_{14}$ und des Chondrosins $C_{12}H_{21}NO_{11}$, ist noch nicht ermittelt. Chondrosin ist eine gummiartige saure Verbindung, die sich mit Basen und mit Säuren verbindet, rechtsdrehend ist und Fehling'sche Lösung reduziert. Bei der Bildung des Chondrosins aus dem Chondroitin wird aus dem letzteren auch Essigsäure abgespalten. Die Spaltung des Chondroitins durch Erhitzen mit Salzsäure entspricht demnach der Gleichung



$$\underset{\text{Chondroitin}}{C_{18}H_{27}NO_{14}} + 3H_2O = \underset{\text{Chondrosin}}{C_{17}H_{21}NO_{11}} + \underset{\text{Essigsäure.}}{3C_2H_4O_2}$$

Chondroitinschwefelsäure zerfällt durch Salzsäure schon in der Kälte in Schwefelsäure und Chondroitin (Schmiedeberg)[1]. — Bei 48stündigem Stehen des Chondrosins mit gesättigtem Barytwasser im Brutschrank bei 40° haben Orgler und Neuberg[2]) Tetraoxyaminokapronsäure $C_6H_7O_2(OH)_4(NH_2)$ in Form des in lasurblauen Nadeln kristallisierenden Kupferoxydsalzes $[C_6H_6O_2(OH)_4(NH_2]_2Cu$ isolieren können.

Nachweis der Chondroitinschwefelsäure im Knorpel und in anderem Material nach Carl Th. Mörner[3]).

»Das betreffende fein zerkleinerte Material wird bei Zimmertemperatur mit 2 Teilen Kalilauge (2% KOH) digeriert. Nach 2 Tagen wird mit 3 Tln. Wasser verdünnt und durch Leinwand filtriert. Die Flüssigkeit wird nun mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt, unmittelbar darauf Baryumkarbonat in überschüssiger Menge hinzugetan und die Mischung nach kurzem Aufkochen filtriert. Nachdem die

[1]) Archiv f. experimentelle Path. und Pharmakol. 28, 355 (1891).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 405 (1902/03).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 335 (1895).

Flüssigkeit auf diese Weise von der Hauptmasse Eiweis, das als Alkalialbuminat auf dem Filter bleibt, befreit ist, wird das Filtrat mit wenig Baryumkarbonat auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird einige Minuten mit Wasser ausgekocht und die abfiltrierte Flüssigkeit, die durch die Baryumbehandlung von präformierter Schwefelsäure vollständig befreit ist, mit Alkohol ausgefällt. Ein hierbei entstandener Niederschlag enthält die Chondroitinschwefelsäure, falls sie sich im untersuchten Material befand; er wird abfiltriert, mit kochendem Alkohol ausgewaschen, in Wasser gelöst und diese Lösung untersucht, 1. ob sie mit klarer Leimlösung und Essigsäure versetzt, einen Niederschlag gibt (s. oben) und 2. ob sie nach dem Kochen mit verdünnter Salzsäure Schwefelsäure sowie reduzierend wirkende Substanz enthält.« Die nach 2. erhaltene Lösung prüfe man also mit Chlorbaryum auf Schwefelsäure und nach dem Uebersättigen mit Natronlauge mit Fehling'scher Lösung auf reduzierend wirkende Substanz.

Mörner hat nach diesem Verfahren noch 0,03 g Chondroitinschwefelsäure, die 100 g Blut zugesetzt waren, mit Leichtigkeit nachweisen können. In allen von Mörner untersuchten Knorpelarten war ohne Ausnahme Chondroitinschwefelsäure in reichlicher Menge nachzuweisen.

Indol-Pr-3-Essigsäure oder Chromogen des Uroroseins[1]).

Indol-Pr-3-Essigsäure wurde zuerst von E. und H. Salkowski[2]) durch Fäulnis von Eiweiß erhalten und Skatolkarbonsäure genannt, da sie beim Erhitzen über den Schmelzpunkt unter Abspaltung von Kohlendioxyd Skatol lieferte. Sie findet sich häufig in normalen wie pathologischen Harnen vor und gibt sich dadurch zu erkennen, daß die betreffenden Harne auf Zusatz von konzentrierter Salzsäure und einer Spur sehr verdünnter Kaliumnitritlösung einen roten Farbstoff, nämlich das Urorosein, liefern. Harne, welche bereits Nitrit enthalten, geben den Farbstoff ohne Zusatz von Alkalinitrit. — A. Ellinger[3]) hat die skatolbildende Substanz künstlich dargestellt und durch diese Synthese nachgewiesen, daß dem Chromogen des Uroroseins nicht die Formel einer Skatolkarbonsäure, sondern die einer Indol-Pr-3-Essigsäure zukommt.

Synthese nach A. Ellinger. Als Ausgangsmaterial diente die zuerst von E. von Ungern-Sternberg[4]) dargestellte β-Aldehydo-propionsäure, die durch Kochen der Akonsäure mit

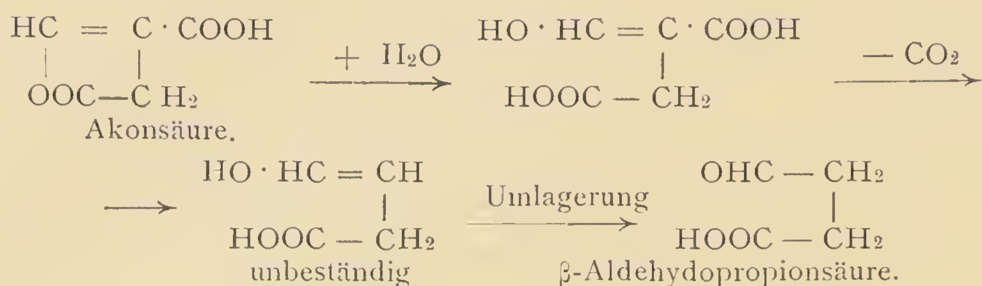
[1]) »Pr« bedeutet Pyrrol und »Pr-3-Essigsäure«, daß sich der Essigsäurerest im Pyrrolkern in Stellung »3« befindet.

[2]) »Ueber die Skatolbildende Substanz«. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 13, 2217 (1880).

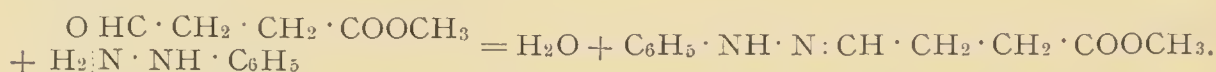
[3]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 37, 1801 (1904).

[4]) »Ueber die β-Aldehydo-propionsäure aus Akonsäure«. Inaug.-Dissertation. Königsberg 1904.

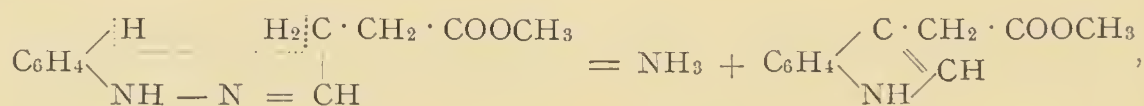
Wasser im Sinne der folgenden Gleichungen in vortrefflicher Ausbeute erhalten wird:



Das trockene Silbersalz der β-Aldehydo-propionsäure wurde mit Hilfe von Jodmethyl in den β-Aldehyd-propionsäuremethylester $OHC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOCH_3$ und dieser in absolut ätherischer Lösung mit Phenylhydrazin in das zugehörige Phenylhydrazon übergeführt:

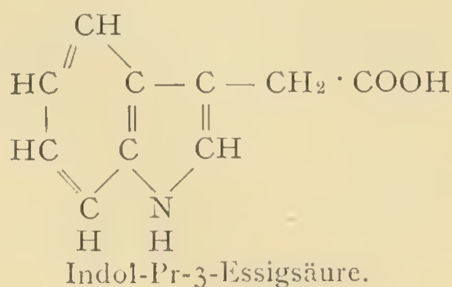


Wird dieses Phenylhydrazon des β-Aldehydo-propionsäuremethylesters mit Chlorzink zusammengeschmolzen oder mit alkoholischer Schwefelsäure 5 Stunden unter Rückfluß gekocht, so geht es unter Abspaltung von Ammoniak in den Indol-Pr-3-Essigsäuremethylester über:

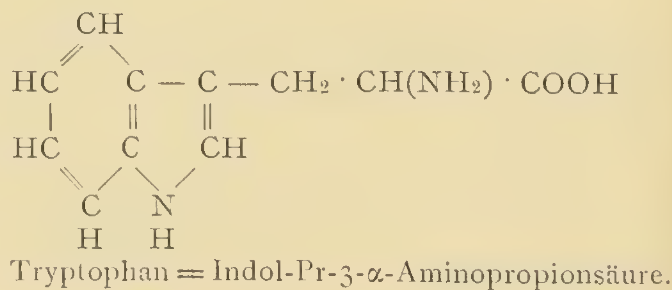


der beim Verseifen mit alkoholischer Kalilauge und Ansäuern die Indol-Pr-3-Essigsäure selbst lieferte. Die so künstlich erhaltene Säure erwies sich in allen ihren Reaktionen, im Schmelzpunkt und in der Kristallform, identisch mit der von E. und H. Salkowski aus Fäulnisgemischen erhaltenen Skatolkarbonsäure.

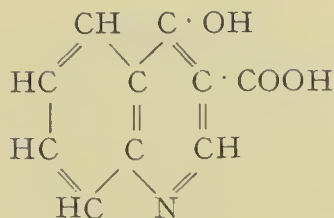
Da das Tryptophan in naher Beziehung zur Indol-Pr-3-Essigsäure steht — durch aerobe Bakterien wird es in diese Säure übergeführt —, so mußte auch für dieses eine neue Formel aufgestellt werden. — Der Tierversuch hatte Ellinger gezeigt, daß verfüttertes Tryptophan im Organismus des Hundes in Kynurensäure oder in γ-Oxy-β-chinolinkarbonsäure übergeht. Durch das Ergebnis dieses Versuchs ist nicht nur die Herkunft der Kynurensäure in verständlicher Weise aufgeklärt, sondern auch die Konstitution des Tryptophans mit größter Wahrscheinlichkeit entschieden. Den drei, in naher Beziehung zu einander stehenden Substanzen kommen höchst wahrscheinlich die folgenden Konstitutionsformeln zu.



Indol-Pr-3-Essigsäure.



Tryptophan = Indol-Pr-3-α-Aminopropionsäure.



Kynurensäure = γ-Oxy-β-Chinolinkarbonsäure.

Eigenschaften. Die Indol-Pr-3-Essigsäure kristallisiert in Blättchen, die in Alkohol und Aether leicht, in Wasser schwer löslich sind und die bei 164 bis 165° schmelzen. Beim Umkristallisieren, namentlich aus Wasser, treten bedeutende Verluste ein. Bei stärkerem Erhitzen zerfällt sie in Skatol und Kohlendioxyd.



Die Säure wird durch die von E. und H. Salkowski angegebenen Reaktionen näher charakterisiert:

1. Mit einigen Tropfen Salzsäure und zwei Tröpfchen einer stark verdünnten Eisenchloridlösung erwärmt, färbt sich eine Lösung der Indolessigsäure intensiv violett.

2. Mit einigen Tropfen Salpetersäure vom spez. Gew. 1,2 und wenigen Tropfen Kaliumnitritlösung (1 % ig) tritt ziemlich rasch eine kirschrote Färbung auf, und alsbald scheidet sich ein roter Farbstoff, nämlich Urorosein, ab.

3. Mit dem gleichen Volumen Salzsäure von 1,12 spez. Gew. und einigen Tropfen Chlorkalklösung (1 % ig) versetzt, färbt sich die Mischung allmählich purpurrot und liefert einen ebenso gefärbten Niederschlag.

Bemerkenswert ist, daß sich unreine wässerige Lösungen der Indol-Pr-3-Essigsäure schon beim Eindampfen weitgehend zersetzen.

Harnfarbstoffe.

Der normale Harn des Menschen enthält wohl immer mehrere Farbstoffe. Der Harnfarbstoff, welcher die gelbe Farbe des Harns bedingt, ist das Urochrom. Ferner findet sich im Harn meist Uroerythrin vor, das auch die Farbe des sedimentum lateritium ausmacht, sowie eine sehr kleine Menge Hämatoporphyrin. — Der frisch gelassene Harn enthält endlich ein, Urobilinogen genanntes Chromogen, welches unter Einwirkung von Licht und Luft in den gelben Farbstoff Urobilin übergeht. — Außer Urobilinogen enthält der Harn noch andere Substanzen, aus welchen durch Einwirkung chemischer Agentien, besonders Säuren, Farbstoffe hervorgehen können. Ein solches Chromogen, das sich in vielen normalen und pathologischen Harnen vorfindet, ist die Indolessigsäure, welche durch konzentrierte Salzsäure bei Gegenwart einer Spur Kaliumnitritlösung in den roten Farbstoff Urorosein übergeführt wird. Durch Einwirkung von Säuren auf die im Harne vorkommenden Kohlehydrate können Farbstoffe wie die Huminsubstanzen entstehen.

Urochrom.

Den Namen »Urochrom« hat Thudichum einem Farbstoffe gegeben, der zuerst von ihm aus Harn isoliert wurde. Garrod hat dann diesen Farbstoff näher untersucht, aber das Präparat nicht analysiert. In den letzten Jahren ist Urochrom von verschiedenen Seiten untersucht worden. Nach Ansicht von Bondzynski, Dombrowski und Panek[1]) gehört Urochrom in die Gruppe der Alloxyproteinsäuren, die sich von anderen Harnproteinsäuren durch ihre Fällbarkeit durch Kupferacetat unterscheiden. In 24 Stunden werden mit dem Harn 0,4 bis 0,7 g Urochrom ausgeschieden; bei Infektionskrankheiten ist die Urochromausscheidung gesteigert. (Dombrowski.)

Gewinnung des Urochroms aus Harn nach S. Dombrowski[2]). Man fällt 10 Liter Harn mit einer Lösung von 86 g Calciumacetat, 53 g Baryumacetat und 43 ccm 21%iger Ammoniakflüssigkeit aus, filtriert nach mehrstündigem Stehen ab, neutralisiert das so von Phosphorsäure, Schwefelsäure und von fast aller Harnsäure befreite Filtrat mit Essigsäure und versetzt sodann mit Kupferacetatlösung, die vorher durch Ammoniak neutralisiert wurde. Der sich alsbald bildende, amorphe, grüngraue Niederschlag wird nach 24 Stunden abfiltriert, ausgewaschen, unter Wasser verteilt und bei 100° mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs in einer Kohlensäureatmosphäre im Vacuum unter gelindem Erwärmen wird die filtrierte Flüssigkeit mit Barytwasser im geringen Ueberschusse versetzt, schnell filtriert, Kohlensäure eingeleitet, abermals filtriert, das Filtrat im Vacuum auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Alkohol ausgefällt. Auf diese Weise wurde das Baryumsalz des Urochroms erhalten. Durch Zerlegen des mit Kupferacetat erhaltenen Niederschlags mit Schwefelwasserstoff bei 45° wurden braunrot gefärbte Filtrate erhalten, welche den freien Farbstoff Urochrom enthielten.

Eigenschaften. Nach Dombrowski hat Urochrom die Eigenschaften einer Säure, indem es in Wasser leicht lösliche, in Alkohol unlösliche, amorphe Baryum- und Natriumsalze wie auch ein amorphes Silbersalz bildet. Außer durch Kupferacetat wird Urochrom aus seinen Lösungen durch basisches Bleiacetat, Quecksilberacetat, Eisenchlorid, Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure gefällt. Je nach der Arbeitsweise ist das bis jetzt gewonnene Urochrom ein braunes oder dunkelgelbes, amorphes, in Wasser und in Weingeist sehr leicht lösliches, in absolutem Alkohol sehr schwer lösliches, in Aether, Benzol und Chloroform unlösliches Pulver. Von Mineralsäuren wird es unter Bildung brauner Substanzen zersetzt. Urochrom zeigt keinen Absorptionsstreifen im Spektrum und fluoresziert nicht auf Zusatz von Ammoniak und Chlorzink (Unterschied von Urobilin). Urochrom ent-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 110 (1905).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 188 (1907/08) und Compt. rend. de l'Acad. des sciences 145, 575 (1907).

hält nach Dombrowski etwa 5% Schwefel, der schon durch kalte Alkalilauge abgespalten wird; auf Zusatz von Bleiacetat erfolgt dann Abscheidung von Schwefelblei. Urochrom wirkt reduzierend; aus einer stark verdünnten Mischung von Eisenchlorid und Ferricyankaliumlösung wird sofort Berlinerblau gefällt und Jodsäure wird durch Urochrom zu Jodwasserstoffsäure reduziert. Nach Untersuchungen aus der neuesten Zeit soll Urochrom schwefelfrei sein (Hohlweg, Salomonsen, Mancini). Urochrom enthält eine Pyrrolgruppe, denn es gibt stark die Fichtenspanreaktion.

H. Hohlweg[1]) hat das Urochrom aus normalem Menschenharn in der folgenden Weise isoliert. Der normale Harn wird mit Kalkmilch alkalisch gemacht, mit Chlorcalcium völlig ausgefällt, abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure neutralisiert, im Vacuum zum Syrup eingeengt, der Syrup mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Tierkohle mehrere Stunden geschüttelt; die auf einem Filter gesammelte Tierkohle, welche nahezu das ganze Urochrom des Harns adsorbiert enthält, wird mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen, auf Tontellern bei 40^0 getrocknet, mit Eisessig geschüttelt und das Urochrom aus der Eisessiglösung durch Zusatz des zehnfachen Volumens Aether gefällt. Der so gewonnene harzige Körper liefert nach dem Trocknen bei 40^0 eine pulverisierbare, braune Substanz. Aus 24 Liter normalem Harn, die auf 500 ccm eingedampft waren, wurden 3,1 g trockenes Urochrom erhalten. Die wässerige Lösung der Hohlweg'schen Substanz hat die Farbe des normalen Harns und keine Absorptionsstreifen im Spektrum. Nach Behandlung mit reinem Acetaldehyd in der Wärme und nachherigem Zusatz von ammoniakalischer Chlorzinklösung nach 24 Stunden zeigt es deutliche grüne Fluoreszenz; ob diese durch gebildetes Urobilin bedingt ist, ist noch fraglich. — Zur Extraktion des Urochroms aus der Tierkohle ist auch Methylalkohol brauchbar.

Urobilin.

Urobilin ist ein zuerst von Jaffé aus Harn dargestellter Farbstoff, der ein charakteristisches Absorptionsspektrum zeigt und durch eine starke Fluoreszenz ausgezeichnet ist. Im frisch gelassenen Harne ist das Urobilin, wenn nicht ausschließlich, so doch hauptsächlich als Chromogen, als Urobilinogen, vorhanden. Reichlicher findet es sich im Harne bei verschiedenen Krankheiten; die Urobilinmenge kann stark vermehrt sein bei Blutergüssen und solchen Krankheiten, bei welchen rote Blutkörperchen in größerer Menge zu Grunde gehen, ferner bei Erkrankungen der Leber, bei vielen fieberhaften Infektionskrankheiten und bei verschiedenen Vergiftungen, wie dies durch die Einwirkung von Blutgiften wie Antipyrin und Antifebrin der Fall ist (Urobilinurie).

Darstellung aus dem Harn. Man versetzt eine größere

[1]) Biochemische Zeitschr. 13, 199 (1908).

Menge Harn mit einer Mischung aus 1 Vol. gesättigter Chlorbaryumlösung und 2 Vol. gesättigtem Barytwasser, und zwar nehme man auf 100 Tle. Harn 30 Tle. dieser Mischung. Hierdurch werden Harnsäure und etwa vorhandenes Hämatoporphyrin entfernt. Man filtriert dann ab, entfernt aus dem Filtrate mit konzentrierter Natriumsulfatlösung das überschüssige Baryum, neutralisiert nahezu mit verdünnter Schwefelsäure, filtriert abermals ab und sättigt das Filtrat mit zerriebenem Ammoniumsulfat. Hierdurch wird das Urobilin des Harns ausgefällt, worauf Méhu[1]) zuerst hingewiesen hat. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgewaschen und, nach dem Trocknen samt Filter auf einem Tonteller, erst mit wenig verdünnter Schwefelsäure versetzt, dann mit einer Mischung aus 1 Tl. Aether und 2 Tln. Alkohol warm ausgezogen und abfiltriert. Das Filtrat wird mit Chloroform gemischt, dann in einem Scheidetrichter mit ungefähr dem doppelten Volumen Wasser gut umgeschüttelt. Die abgetrennte Chloroformlösung, welche das Urobilin enthält, wäscht man mit etwa dem doppelten Volumen Wasser und entzieht ihr dann das Urobilin durch Umschütteln mit stark verdünntem wässerigem Ammoniak, das beim Eindunsten das Urobilin zurückläßt. Auch durch Ansäuern der ammoniakalischen Lösung kann das Urobilin gefällt werden.

Eigenschaften. Urobilin ist bis jetzt nur amorph erhalten worden; es zeigt auch nicht immer genau die gleichen Eigenschaften, selbst wenn es nach demselben Verfahren aus verschiedenen Harnen gewonnen wird. Meist dürften demselben noch andere Harnfarbstoffe, wenn auch nur in geringer Menge anhaften. Es bildet ein rotbraunes, braunes, rotes oder rotgelbes Pulver, ist leicht löslich in Alkohol, Amylalkohol und Chloroform, wenig löslich in Wasser und Aether. Von wässerigen Alkalilaugen und von Ammoniak wird es leicht gelöst und aus diesen Lösungen durch Säuren wieder gefällt. Die alkoholischen Lösungen des Urobilins erscheinen verschieden gefärbt und zwar je nach der Konzentration und ob sie neutral, sauer oder alkalisch reagieren. In seinen neutralen alkoholischen Lösungen erscheint es je nach der Konzentration braungelb, gelb oder rosa mit schön grüner Fluoreszenz; alkalische Lösungen sind mehr gelb und saure alkoholische Lösungen des Urobilins sind rosenrot, rotgelb bis braun gefärbt; die letzteren fluoreszieren nicht.

Versetzt man die ammoniakalischen Urobilinlösungen mit etwas Chlorzink, so werden sie rot und zeigen selbst noch bei starker Verdünnung eine sehr starke, schön grüne Fluoreszenz.

Urobilinogen, die Grundsubstanz des Urobilins, findet sich in frisch gelassenem Harn, in frischen Faeces und auch meist in der Galle. Wie das Urobilin wird es durch Sättigen des Harns mit Ammoniumsulfat gefällt. Es zeigt keine Fluoreszenz und keinen Ab-

[1]) Journ. de Pharm. et de Chim. [4] 28, 159 (1878).

sorptionsstreifen; es wird aber beim Stehen seiner Lösungen, besonders seiner mineralsauren, am Sonnenlichte und bei Luftzutritt in Urobilin übergeführt; Oxydationsmittel bewirken diese Umwandlung fast momentan.

Nachweis des Urobilins im Harn.

1. Im urobilinreicheren Harne, wie in vielen Fieberharnen, kann das Urobilin meist direkt oder nach Zusatz von Ammoniak und Chlorzink mit Hilfe des Spektroskops nachgewiesen werden; es zeigt sich ein dunkler und ziemlich scharf begrenzter Absorptionsstreifen, ziemlich in der Mitte zwischen E und F des Spektrums. Man filtriert den Harn nach dem Zusatz von Ammoniak ab und setzt erst zum Filtrate das Chlorzink. Auch die grüne Fluoreszenz ist meist zu erkennen.

2. Gelingt der direkte Nachweis im Harn nicht, so säuert man 20 ccm Harn mit einigen Tropfen Salzsäure oder Schwefelsäure an und schüttelt in einem Scheidetrichter mit ca. 10 ccm Amylalkohol vorsichtig und gelinde aus[1]). Die abgegossene amylalkoholische Lösung wird sowohl direkt, als auch nach Zusatz einiger Tropfen ammoniakalischer Chlorzinklösung spektroskopisch und im letzteren Falle auch auf grüne Fluoreszenz untersucht. Man verwende eine Lösung, die 1 g Chlorzink in 100 ccm ammoniakhaltigem Alkohol enthält.

3. Probe von Schlesinger[2]). Man versetzt den Harn, eventuell samt Sediment, mit dem gleichen Volumen absolutem Alkohol, der 10% fein zerriebenes Zinkacetat zum Teil gelöst, zum Teil suspendiert enthält und der vor dem Zusatz zum Harn gut umzuschütteln ist. Hierdurch werden störende Stoffe beseitigt. Man filtriert ab und untersucht das Filtrat spektroskopisch und auf grüne Fluoreszenz.

Uroerythrin.

Uroerythrin findet sich sehr häufig im normalen Harn vor; es bedingt die schön rote Farbe des sog. Ziegelmehlsediments. Uroerythrin ist vermehrt nach Muskelanstrengungen und starkem Schwitzen, bei Digestionsstörungen, Herz- und Lungenaffektionen, besonders bei rheumatischen Krankheiten und solchen, welche Zirkulationsstörungen in der Leber hervorrufen[3]).

Darstellung aus dem Ziegelmehlsediment nach Garrod. Dar Uratsediment, das sich beim Abkühlen des Harns bildet, wird abfiltriert, in Wasser unter gelindem Erwärmen gelöst, die Lösung mit Ammoniumchlorid gesättigt, der im wesentlichen aus Uraten und Uroerythrin bestehende Niederschlag abfiltriert und mit gesättigter Ammoniumchloridlösung so lange gewaschen, bis alles Urobilin entfernt ist. Nun zieht man den Niederschlag an einem dunkeln Orte einige Stun-

---

[1]) Wegen der leichten Bildung einer Emulsion vermeide man ein stärkeres Schütteln des Harns mit dem Amylalkohol.

[2]) Deutsche med. Wochenschrift 1903, S. 561.

[3]) Nach H. Thierfelder, Physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse, VIII. Auflage.

den mit warmem Alkohol aus, versetzt die abfiltrierte alkoholische Lösung mit mindestens 2 Tln. Wasser und schüttelt zur Entfernung von etwa vorhandenem Hämatoporphyrin mehrmals mit Chloroform aus. Fügt man jetzt zur wässerig-alkoholischen Lösung einige Tropfen Essigsäure bis zur ganz schwachsauren Reaktion und schüttelt abermals mit Chloroform aus, so nimmt dieses das Uroerythrin auf. Nach dem Waschen mit Wasser läßt man die Chloroformlösung an einem dunklen Orte eindunsten.

Uroerythrin ist bis jetzt nur amorph erhalten worden, ist rosa gefärbt und wird, besonders in seinen Lösungen, durch Belichtung leicht gebleicht, eine Erscheinung, die für diesen Harnfarbstoff charakteristisch zu sein scheint.

Es ist löslich in Amylalkohol, Essigsäure, Alkohol, Chloroform, am wenigsten in Wasser. Verdünntere Uroerythrinlösungen sind rosa gefärbt, konzentriertere sind mehr orangefarben. Im Unterschiede zu Urobilinlösungen fluoreszieren sie nicht, und zwar auch nicht nach Zusatz von Chlorzink und Ammoniak. — Durch konzentrierte Schwefelsäure werden die Lösungen des Uroerythrins karminrot, durch Kali- oder Natronlauge, durch Purpur und Blau hindurch schnell grün gefärbt. Die Lösungen des Uroerythrins, auch die mit Ammoniak und Chlorzink versetzten, zeigen eine starke Auslöschung des Spektrums, die in der Mitte zwischen D und E anfängt und bis F hin sich erstreckt und eigentlich aus zwei Streifen besteht, die in ihrer Mitte durch einen Schatten verbunden sind.

Nachweis des Uroerythrins im Harn.

Man schüttelt eine größere Menge Harn vorsichtig mit Amylalkohol aus, der das beste Lösungsmittel für Uroerythrin ist, und trennt den Amylalkoholauszug vom Harn in einem Scheidetrichter. Uroerythrin wird dann daran erkannt, daß der Amylalkoholauszug rosa oder orangerot gefärbt ist, am Lichte allmählich verblaßt und das Spektrum der Uroerythrinlösungen zeigt. — Auch das Verhalten der Lösung gegen Alkalilauge und gegen konzentrierte Schwefelsäure kann zum Nachweise des Uroerythrins dienen.

Urorosein.

Das Chromogen des Uroroseins ist die unter den Fäulnisprodukten der Eiweißstoffe aufgefundene und von Ellinger[1]) künstlich erhaltene Indol-Pr-3-Essigsäure (s. diese), die sich sehr häufig im Harn des Menschen vorfindet; dieses Chromogen gibt sich dadurch zu erkennen, daß es auf Zusatz von konzentrierter Salzsäure und einer Spur sehr verdünnter Kaliumnitritlösung in einen roten Farbstoff, nämlich in Urorosein, übergeht. Harne, in welchen beim Stehenlassen aus vorhandenen Nitraten durch die Einwirkung von Mikroorganismen salpetrigsaure Salze entstanden sind, liefern den Farbstoff mit Salzsäure allein, also ohne Zusatz von Alkalinitrit.

[1]) Berichte d. chem. Ges. 37, 1801 (1894).

Urorosein ist in Wasser, Alkohol und Amylalkohol mit schön roter Farbe löslich, aber unlöslich in Chloroform und in Aether. Die Farbe der Lösungen des Uroroseins verschwindet auf Zusatz von Alkalilaugen, um auf Zusatz von Säuren wiederzukehren. Die Lösung des Uroroseins in Amylalkohol zeigt im Spektrum einen scharfen Streifen in Grün zwischen D und E, näher an D.

Gallenfarbstoffe.

Die in der Menschengalle immer oder fast immer vorkommenden Farbstoffe sind das *Bilirubin*, das *Biliverdin* und das *Urobilin*, das auch als *Urobilinogen* vorhanden ist. Es sollen auch noch andere Farbstoffe, Bilifusein, Biliprasin, Bilicyanin, in der Galle des Menschen und besonders in Gallensteinen vorkommen; diese Farbstoffe sind aber chemisch noch so wenig untersucht, daß man zur Zeit nicht angeben kann, ob sie einheitlich zusammengesetzte Verbindungen oder Gemenge verschiedener Farbstoffe darstellen.

Der *Blutfarbstoff* ist höchst wahrscheinlich die Muttersubstanz der Gallenfarbstoffe. Alle in dieser Richtung gemachten Beobachtungen und aufgefundenen Tatsachen sprechen zugunsten dieser Annahme. Man hat gefunden, daß durch Reduktion des aus dem Blutfarbstoff hervorgehenden *Hämatins* Urobilin entsteht, ein Farbstoff, der dem Hydrobilirubin sehr ähnlich ist. Ferner ist das *Hämatoporphyrin* mit dem Bilirubin der Galle *isomer* und diesem chemisch nahe verwandt. — Nach subkutanen oder intraperitonealen Injektionen von Hämoglobinlösungen bei einem Hunde konnte eine viele Stunden anhaltende erhöhte Farbstoffausscheidung durch die Galle beobachtet werden; die Vermehrung betrug sogar über 60% gegenüber der normalen Ausscheidung.

Endlich hat *Küster* nachgewiesen, daß aus den alkalischen *Bilirubin*lösungen durch Erwärmen unter Luftzutritt oder durch Oxydation des Bilirubins mit Natriumdichromat in Eisessiglösung die gleiche *Hämatinsäure* oder ihr Imid entsteht, welche aus dem *Hämatin* erhalten wird. — Es darf aber andererseits nicht verschwiegen werden, daß die Umwandlung des Gallenfarbstoffes in Blutfarbstoff bis jetzt nicht gelungen ist.

Bilirubin, $C_{16}H_{18}N_2O_3$ oder nach *Küster* $C_{32}H_{36}N_4O_6$, kommt im freien Zustande in der Menschengalle und als *Bilirubinkalk* in den meisten Gallensteinen vor; es ist ferner im Dünndarminhalte und im Harne bei Ikterus enthalten. Das Bilirubin wird amorph und kristallisiert erhalten; das amorphe Bilirubin bildet ein rotgelbes oder rotbraunes Pulver, das aus heißem Dimethylanilin in breiten, schief abgeschnittenen Säulen oder in Keulenformen kristallisiert (*Küster*); aus Chloroform scheidet es sich in rhombischen Tafeln ab. Bilirubin ist unlöslich in Wasser, sehr wenig löslich in Aether, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Amylalkohol, fetten Oelen und Glyzerin; in Alkohol ist es etwas leichter löslich. In kaltem Dimethylanilin ist die Löslichkeit gleich 1 : 100,

in der Wärme löst es sich darin erheblich leichter, in kaltem Chloroform ist es schwer, in warmem leichter löslich. Alle Lösungen zeigen gelbe oder bräunlichrote Farbe. Selbst bei einer Verdünnung von 1 : 500 000 ist die gelbliche Färbung in einer 1,5 cm dicken Schicht noch deutlich zu erkennen. In wässerigen Alkalilaugen löst sich Bilirubin leicht auf und wird aus diesen Lösungen, soweit es sich nicht zersetzt, durch Salzsäure unverändert wieder abgeschieden. Aus seiner Chloroformlösung läßt sich Bilirubin mit verdünnter Natronlauge ausschütteln (Unterschied von Luteïn). Versetzt man eine Lösung des Bilirubins in wässerigem Ammoniak mit Chlorcalcium, so fällt ein flockiger, rostfarbiger Niederschlag von Bilirubinkalk aus. Auch Bleizucker, Bleiessig, Baryumchlorid und Silbernitrat fällen ammoniakalische Bilirubinlösungen.

Biliverdin, $C_{16}H_{18}N_2O_4$ oder $C_{32}H_{36}N_4O_8$, ist wohl das erste Oxydationsprodukt des Bilirubins, findet sich im Darminhalt und im Harne bei Ikterus vor. Zu seiner Darstellung läßt man eine verdünnte alkalische Bilirubinlösung in dünner Schicht in einer Schale an der Luft stehen, bis die Farbe braungrün geworden ist, säuert dann mit Salzsäure an, wäscht den entstandenen Biliverdinniederschlag mit Wasser chlorfrei, löst ihn dann in Alkohol und fällt ihn mit Wasser wieder aus. Dem getrockneten Niederschlage entzieht man schließlich mit Chloroform etwa noch beigemengtes Bilirubin.

Biliverdin ist amorph, dunkelgrün, unlöslich in Wasser, Aether und Chloroform (Unterschied von Bilirubin), aber mit schön grüner Farbe löslich in Alkohol und in Eisessig. Von Alkalilaugen wird es mit braungrüner Farbe gelöst und aus diesen Lösungen durch Säuren wieder unverändert ausgefällt.

Bilirubin und Biliverdin werden durch Wasserstoff in statu nascendi in Hydrobilirubin, $C_{32}H_{40}N_4O_7$, übergeführt, welches mit dem Urobilin des Harns und mit dem Stercobilin des Darminhalts große Aehnlichkeit zeigt.

Nachweis der Gallenfarbstoffe im Harn.

Der Gehalt eines Harns an Gallenfarbstoffen gibt sich meist schon an der charakteristischen Färbung des Harns zu erkennen; gallenfarbstoffhaltige Harne können gelbbraun, rotbraun, grünlichbraun oder fast rein grün gefärbt sein. Der beim Schütteln eines derartigen Harns sich bildende Schaum ist deutlich gelb oder gelblichgrün gefärbt. Ikterischer Harn ist meist etwas trübe und das sich bildende Sediment ist häufig gefärbt.

Von den Proben, die zum Nachweise der Gallenfarbstoffe im Harne in Vorschlag gebracht sind, können die folgenden empfohlen werden.

1. Die Gmelin-Rosenbach'sche Probe. Man gießt eine nicht zu kleine Menge des Harns (etwa 50 ccm) wiederholt durch ein kleineres Filter, läßt dieses gut abtropfen und breitet es dann auf einer Glasplatte aus. Bei Vorhandensein von Gallenfarbstoff ist die Innenseite des Filters von den zurückgehaltenen Epithelzellen und von Schleim mehr oder weniger stark gelb gefärbt. Betupft man nun die

Innenseite des Filters mit konzentrierter Salpetersäure, die mit einer Spur roter rauchender Salpetersäure versetzt ist, so bildet sich ein blaßgelber Fleck, der von farbigen Ringen umgeben ist, und zwar ist die Reihenfolge der Farben von innen nach außen gelbrot, rot, violett, blau und grün. — Die Probe ist sehr empfindlich; zudem ist eine Verwechslung der Gallenfarbstoffe mit andern Harnfarbstoffen und mit Indikan so gut wie ausgeschlossen.

2. Die Huppert'sche Probe. Man versetzt 10 ccm des Harns erst mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung, dann mit wenig Natrium- oder Ammoniumkarbonatlösung, so lange ein Niederschlag entsteht, schüttelt um, filtriert den entstandenen Niederschlag, der etwa vorhandene Gallenfarbstoffe enthält, ab, spült ihn mit Wasser gut auf und löst ihn auf dem Filter in 4 bis 5 ccm eines Alkohols, der in 100 ccm 5 ccm konzentrierte Salzsäure enthält. Die klare Lösung erhitzt man in einem Reagensglase zum Sieden; sie färbt sich schön grün oder blaugrün, wenn der Harn Gallenfarbstoff enthalten hat.

M. Nakayama[1]) hat die Huppert'sche Probe modifiziert und durch diese Modifikation ihre Schärfe und Sicherheit vergrößert. — Erfordernisse: 1. Eine Mischung aus 99 Tln. absolutem Alkohol + 1 Tl. einer rauchenden Salzsäure, in welcher auf 1 Liter 4 gr Eisenchlorid gelöst sind. 2. Eine 10%ige Baryumchloridlösung. — Ausführung. 5 ccm des sauer reagierenden Harns werden im Rohre einer Handzentrifuge mit dem gleichen Volumen Chlorbaryumlösung gemischt, dann kurze Zeit zentrifugiert. Man dekantiert nun die klare, über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit, übergießt den Niederschlag mit 2 ccm des Reagenses (1), rührt mit einem Glasstäbchen durch und erhitzt zum Sieden. Die über dem Baryumsulfat stehende Flüssigkeit nimmt dabei eine sehr schön grüne oder blaugrüne Färbung an, falls der Harn gallenfarbstoffhaltig ist. Fügt man gelb gefärbte Salpetersäure zur blaugrünen Lösung hinzu, so geht die blaue Farbe in Violett und Rot über.

3. Die Probe von Hammarsten. Man bereitet sich erst ein Gemisch aus 1 Vol. Salpetersäure und 19 Vol. Salzsäure, jede Säure von etwa 25%. Dieses Säuregemisch, das mindestens 1 Jahr lang aufbewahrt werden kann, wird erst verwendet, wenn es durch Stehenlassen an der Sonne gelblich geworden ist. Vor dem Anstellen der Probe wird 1 Vol. dieses gelblichen Säuregemisches mit 4 Vol. Alkohol gemischt. Zu 5 ccm dieses fertigen Reagenses bringt man einige Tropfen des zu untersuchenden Harns und schüttelt um. Sind mehr als Spuren von Gallenfarbstoff vorhanden, so nimmt das Gemisch eine grüne oder blaugrüne, tagelang haltbare Färbung an. — Bei Gegenwart von nur sehr geringen Mengen von Gallenfarbstoff, besonders bei Gegenwart von Blutfarbstoff oder anderen Farbstoffen, gießt man 10 ccm des sauer oder fast neutral reagierenden Harnes in das Rohr einer klei-

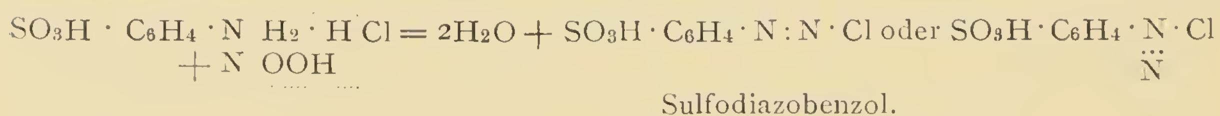
---

[1]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 398 (1902).

nen Handzentrifuge, setzt Baryumchloridlösung hinzu und zentrifugiert etwa eine Minute. Die Flüssigkeit gießt man von dem Bodensatze ab, rührt den letzteren mit etwa 1 ccm obigen Reagenses auf und zentrifugiert von neuem. Man erhält eine schön grüne Lösung, die durch Zusatz von steigenden Mengen des Säuregemenges durch Blau in Violett, Rot und Rotgelb übergeführt werden kann. Die grüne Farbe erhält man noch bei Gegenwart von 1 Tl. Gallenfarbstoff in 500 000 bis 1 000 000 Tln. Harn. Bei Gegenwart von reichlicheren Mengen anderer Farbstoffe ist Chlorcalcium besser als Chlorbaryum (O. Hammarsten)[1]).

4. Die Ehrlich'sche Diazoprobe. Bilirubin bildet Diazo- und Monoazoverbindungen, wie zuerst Ehrlich gefunden hat; z. B. mit saurem Acetophenondiazoniumsulfat bildet es ein Gemisch von Acetophenondisazobilirubin $C_{32}H_{34}N_4O_6 . 2C_8H_7N_2O$, mikroskopische Nädelchen und Acetophenonmonoazobilirubin (Pröscher, Orndorff und Teeple)[2]), letzteres wird aus Chloroform in mikroskopisch kleinen, prismenförmigen Nädelchen erhalten, die im auffallenden Lichte fuchsinartigen Glanz haben, im durchfallenden aber schwarz erscheinen.

Die erforderliche Sulfodiazobenzollösung bereitet man sich aus 1 g Sulfanilsäure[3]), 15 ccm Salzsäure (von 25% HCl) und 0,1 g Natriumnitrit, eine Mischung, die dann mit Wasser auf 1 Liter verdünnt wird. Die aus dem Natriumnitrit durch Salzsäure frei gemachte salpetrige Säure bildet mit der salzsauren Lösung der Sulfanilsäure »Sulfodiazobenzol«:



$$SO_3H \cdot C_6H_4 \cdot NH_2 \cdot HCl + NOOH = 2H_2O + SO_3H \cdot C_6H_4 \cdot N:N \cdot Cl \text{ oder } SO_3H \cdot C_6H_4 \cdot \overset{\cdot\cdot}{N} \cdot Cl \quad (\vdots N)$$

Sulfodiazobenzol.

Man vermischt den Harn mit dem gleichen Volumen verd. Essigsäure und setzt tropfenweise die Sulfodiazobenzollösung hinzu; es tritt hierbei eine dunkelrote Färbung auf, wenn der Harn Gallenfarbstoff enthält. Diese Färbung geht allmählich in Blauviolett über, wenn etwa das gleiche Volumen Eisessig zugesetzt wird. Diese Färbungen sind lange haltbar, besonders die durch Eisessig hervorgerufene Farbung.

5. Probe mit Jod. Man überschichtet in einem Reagensglase den sauer reagierenden Harn mit einer stark verdünnten alkoholischen Jodlösung; enthält der Harn Gallenfarbstoff, so bildet sich sofort oder nach einigen Minuten ein grasgrün gefärbter Ring, der sich manchmal viele Stunden hält. — Ein alkalisch reagierender Harn ist vorher mit Essigsäure anzusäuern. Man verwende eine Jodtinktur mit 0,5 bis höchstens 1 Prozent Jod.

---

[1]) Lehrbuch der physiologischen Chemie, VII. Auflage, 1910.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 411 (1900).

[3]) Sulfanilsäure ist die para-Amidobenzolsulfosäure $C_6H_4(NH_2)(SO_2OH)$ (1,4), kristallisiert aus Wasser in wasserhaltigen Tafeln, aus rauchender Salzsäure aber wasserfrei.

Eiweissstoffe oder Proteine.

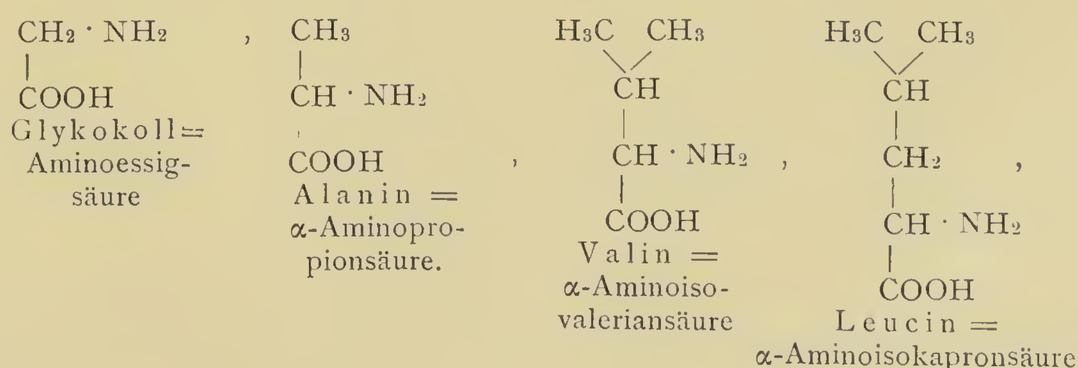
Die sämtlichen Eiweißstoffe, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, enthalten Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff; viele Eiweißstoffe enthalten auch Schwefel und manche, besonders die zusammengesetzten Proteine oder Proteide, daneben auch Phosphor und Eisen.

Alle Proteine sind zweifelsohne hochmolekulare Verbindungen, deren chemische Konstitution zur Zeit noch nicht sicher angegeben werden kann. Sie finden sich bei Menschen und Tieren in allen Geweben sowie in fast allen Flüssigkeiten und bilden häufig die Hauptmasse der festen Bestandteile derselben. Sehr arm an Proteinen sind unter normalen Verhältnissen Schweiß, Tränen und der Harn.

Alle Proteine werden beim Erhitzen allmählich zersetzt, indem sie dabei den Geruch nach verbranntem Horn entwickeln und Wasser, Kohlensäure, Ammoniak, stickstoffhaltige organische Basen sowie verschiedene brennbare Gase abgeben; gleichzeitig bleibt Kohle in reichlicher Menge zurück.

Wenn auch die Konstitution der Proteine noch nicht angegeben werden kann, so ist es doch geglückt, die Proteine in verschiedener Weise, besonders durch hydrolytische Spaltung, in eine große Zahl wohl definierter, meist einfach zusammengesetzter Bruchstücke aufzuspalten. Aus diesen Bruchstücken müssen die Moleküle der Proteine aufgebaut sein; sie sind als die Bausteine der Eiweißstoffe aufzufassen. Man hat die Eiweißstoffe aufgespalten mit Hilfe der Mineralsäuren, z. B. durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure, ferner durch Kochen mit Alkalilaugen oder Erhitzen mit gesättigtem Barytwasser auf 150°, sowie durch proteolytisch wirkende Enzyme, z. B. Trypsin und durch bakterielle Einwirkung bei der Fäulnis. — Auch durch Schmelzen mit Aetzkali sowie durch Oxydation mit Kaliumpermanganat oder Wasserstoffsuperoxyd werden die Proteine weitgehend aufgespalten. Als Produkte der hydrolytischen Spaltung der Eiweißstoffe durch Mineralsäuren sind bis jetzt die folgenden stickstoffhaltigen Substanzen erhalten worden:

1. Monoaminosäuren, nämlich



$H_3C \quad C_2H_5$
\/
CH
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Isoleucin = Methyläthyl-α-aminopropionsäure

COOH
|
$CH \cdot NH_2$
|
CH_2
|
COOH ,

Asparaginsäure = Aminobernsteinsäure

COOH
|
CH_2
|
CH_2
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Glutaminsäure = α-Aminoglutarsäure

$CH_2 \cdot SH$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Cysteïn = α-Amino-β-thiomilchsäure

$CH_2 — S — S — CH_2$
| |
$CH \cdot NH_2$ $CH \cdot NH_2$
| |
COOH   COOH ,

Cystin = Disulfid d. Cysteins

CH
/\
HC   CH
| ||
HC   CH
\/
$C—CH_2$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Phenylalanin = Phenyl-α-aminopropionsäure

C—OH
/\
HC   CH
| ||
HC   CH
\/
$C—CH_2$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Tyrosin = p-Oxyphenylalanin

HC — NH
|| \
C — N // CH
|
CH_2
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Histidin = β-Imidazol-α-aminopropionsäure

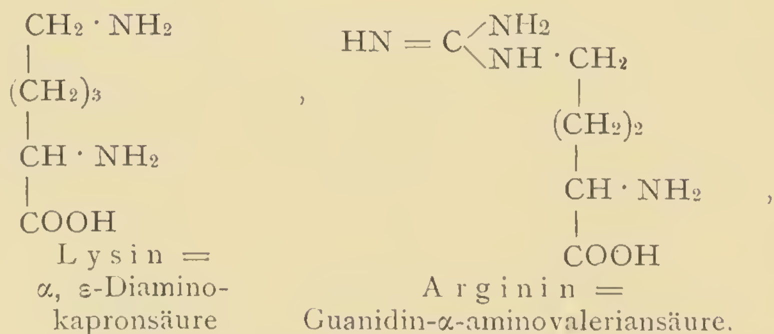
CH
/\
HC   C — C — $CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$,
| || ||
HC   C   CH
\/ \/
CH NH

Tryptophan = Indol-Pr-α-Aminopropionsäure

$CH_2 \cdot OH$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH

Serin = α-Amino-β-Oxypropionsäure.

2. Diaminosäuren:


$CH_2 \cdot NH_2$
|
$(CH_2)_3$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Lysin = α, ε-Diaminokapronsäure

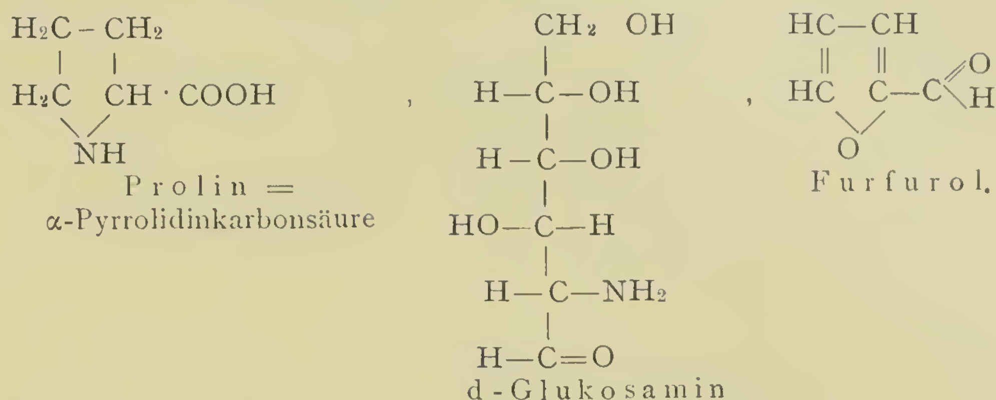
$HN = C \langle {NH_2 \atop NH \cdot CH_2}$
|
$(CH_2)_2$
|
$CH \cdot NH_2$
|
COOH ,

Arginin = Guanidin-α-aminovaleriansäure.

3. Ferner Prolin oder α-Pyrrolidinkarbonsäure; als sekundäre Produkte der Hydrolyse entstehen Ammoniak, Kohlensäure, Schwefelwasserstoff, Aethylsulfid $(C_2H_5)_2S$ und Huminsubstanzen.

d-Glukosamin entsteht bei der hydrolytischen Spaltung vieler Eiweißstoffe, wie bei der des Eieralbumins, des Serumalbumins, des Serumglo-

bulins, des Eiweißes aus Eigelb. Furfurol dürfte zu den sekundären Produkten der Hydrolyse der Proteine gehören.



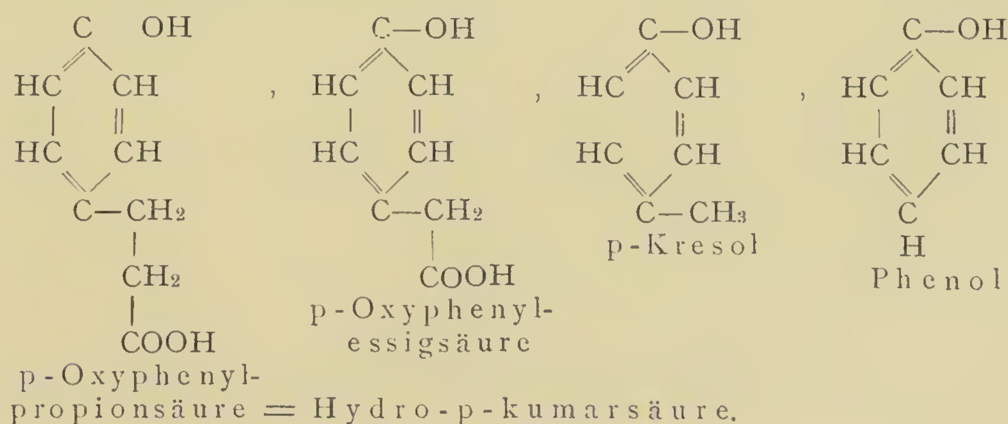
Prolin = α-Pyrrolidinkarbonsäure, d-Glukosamin, Furfurol.

Dadurch daß verschiedene Mengen der unter 1 bis 3 angeführten Elementargruppen an dem Aufbau der Eiweißstoffe beteiligt sind, kommt die Verschiedenheit der letzteren zustande.

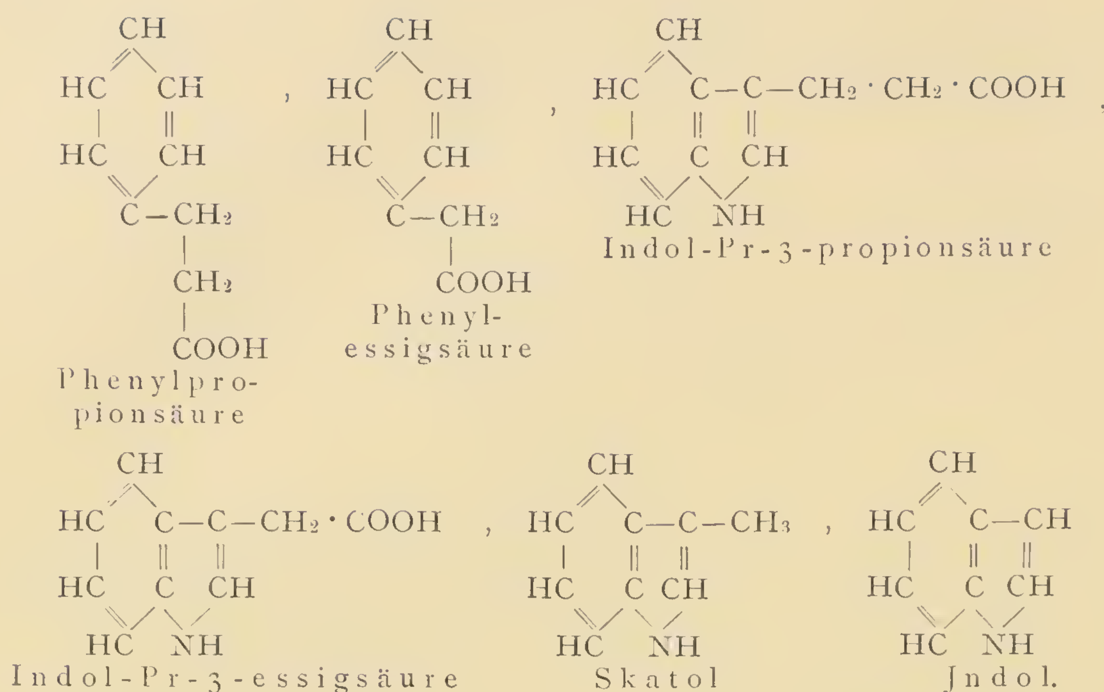
Beim Kochen mit Alkalilaugen erfolgt die Spaltung der Proteine in ähnlicher Weise, wenn auch manche sekundäre Produkte der Hydrolyse hierbei in größerer Menge auftreten. Durch Trypsinverdauung tritt die Aufspaltung der Proteine in ähnlicher Weise ein wie durch Mineralsäuren; es entstehen hierbei in erster Linie Albumosen und Peptone, die dann weiter zu Aminosäuren hydrolysiert werden.

Bei der Fäulnis, also durch bakterielle Zersetzung der Proteine, entsteht gleichfalls eine große Anzahl von Spaltungsbruchstücken; und zwar sind unter den Produkten der bakteriellen Zersetzung die folgenden Stoffe nachgewiesen: Ammoniak, Kohlensäure, Schwefelwasserstoff, Methylmerkaptan $CH_3.SH$, Wasserstoff, Methan, ferner Fettsäuren in relativ großer Menge, nämlich Essigsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure $(CH_3)_2CH.CH_2.COOH$, Valeriansäure, Kapronsäure sowie Bernsteinsäure. Im weiteren die Aminosäuren Leucin und Tyrosin, ferner Hydro-p-kumarsäure, p-Oxyphenylessigsäure, p-Kresol, Phenol, Phenylpropionsäure, Phenylessigsäure, Tryptophan, Indolpropionsäure, Indolessigsäure, Skatol, Indol sowie Ptomaine.

Die Konstitutionsformeln der durch Bakterienfäulnis aus den Proteinen neben den Aminosäuren entstehenden aromatischen Substanzen sind die folgenden:



p-Oxyphenylpropionsäure = Hydro-p-kumarsäure, p-Oxyphenylessigsäure, p-Kresol, Phenol.



Allgemeine Eigenschaften. Die Eiweißstoffe sind nur zum Teil in Wasser löslich; manche derselben werden nur von salzhaltigem Wasser gelöst; sie sind unlöslich in Aether, Benzol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff, fast unlöslich in Alkohol; manche Proteine werden von Alkohol in Spuren gelöst. Sie werden gewöhnlich amorph und nicht ganz frei von Mineralstoffen erhalten, die selbst durch Dialyse meist nicht vollkommen entfernt werden können. Ihre Lösungen, die alle *Linksdrehung* zeigen, diffundieren im Unterschiede zu den Kristalloiden außerordentlich langsam durch tierische Membrane und Pergamentpapier. Die Eiweißstoffe haben den Charakter der Aminosäuren, indem sie sich wie diese sowohl wie *Basen* als auch wie *Säuren* verhalten; dementsprechend werden sie von Alkalilaugen und von kalten konzentrierten Mineralsäuren gelöst, indem hierbei lockere, nicht nach bestimmten Verhältnissen zusammengesetzte Verbindungen entstehen; gleichzeitig werden die nativen Eiweißstoffe *denaturiert*, wie man zu sagen pflegt, nämlich in *Acidalbumine* und *Alkalialbuminate* übergeführt. Die Schnelligkeit, mit der diese Umwandlung erfolgt, ist bei den verschiedenen Eiweißstoffen verschieden und ist besonders abhängig von der Konzentration der betreffenden Säure oder Lauge und von der Temperatur. — *Ausfällung und Aussalzen.* Durch Alkohol, besonders absoluten, werden die Eiweißstoffe aus ihren Lösungen, ohne Aenderung ihrer Eigenschaften mehr oder weniger vollständig abgeschieden. Ebenso erfolgt die Abscheidung aus ihren wässerigen Lösungen durch Zusatz mancher *Neutralsalze*, wie *Ammoniumsulfat*, *Zinksulfat* oder auch durch *Magnesiumsulfat* oder *Chlornatrium*. Die Eiweißstoffe werden »ausgesalzen«, ohne daß ihre Eigenschaften geändert werden. — *Koagulierte Eiweißstoffe.* Wird eine wässerige, salzhaltige Eiweißlösung, wie eiweißhaltiger Harn, bei schwach saurer Reaktion erhitzt, so scheidet sich *koaguliertes Eiweiß* ab. Die gleiche Umwandlung erfolgt bei längerer Einwirkung von Alkohol auf neutrale Eiweißlösungen. Sämtliche koagulierten Eiweißstoffe sind

unlöslich in kaltem und heißem Wasser, in verdünnten Salzlösungen, in Alkohol und in Aether und lösen sich nur schwer in verdünnten Alkalilaugen, in wässerigem Ammoniak, sowie in verdünnter Salzsäure. Durch starke Mineralsäuren werden sie in Acidalbumine und durch konzentrierte Alkalilaugen in Alkalialbuminate übergeführt.

Die nativen Eiweißstoffe, die im menschlichen Harn vorkommen können, sind hauptsächlich Albumine und Globuline. Albumine sind in Wasser leicht lösliche Eiweißstoffe, deren wässerige Lösungen nicht gefällt werden durch sehr verdünnte Säuren und auch nicht bei neutraler Reaktion durch Sättigung mit Chlornatrium oder Magnesiumsulfat oder durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat, wohl aber erfolgt Fällung durch Ganzsättigung mit dem letzteren Salze. Bei Gegenwart von neutralen Alkalisalzen oder Salzen der alkalischen Erden werden die Albumine beim Erhitzen ihrer wässerigen Lösungen gefällt und in koagulierte Eiweißstoffe übergeführt. — Serumalbumin findet sich reichlich im Blutplasma und Blutserum, in der Lymphe, im Chylus, in pathologischen Transsudaten und kommt bei Nierenkrankheiten von allen Eiweißstoffen in größter Menge im Harne vor. Serumalbumin ist in Wasser klarlöslich und gerinnt in 1%iger, möglichst salzfreier Lösung bei ca. 50°, bei Gegenwart von viel Kochsalz aber erst bei erheblich höherer Temperatur.

Globuline sind in reinem Wasser unlöslich oder sehr schwer löslich, aber löslich in den verdünnten wässerigen Lösungen neutraler Salze, wie von Chlornatrium, Chlorammonium, Magnesiumsulfat. Diese Lösungen werden beim Erhitzen koaguliert. Ebenso werden die Globuline aus ihren salzhaltigen Lösungen bei gewöhnlicher Temperatur abgeschieden, wenn sie mit viel Wasser versetzt oder der Dialyse unterworfen werden. Alle Globuline werden durch Sättigung ihrer neutralen Lösungen mit Magnesiumsulfat bei 30° ohne Aenderung ihrer Eigenschaften ausgefällt, ebenso durch Sättigung mit Ammoniumsulfat, durch dieses Salz meist schon bei Halbsättigung. Einige Globuline werden durch Sättigung ihrer neutralen Lösungen mit Kochsalz gefällt; zu diesen Globulinen gehören Serumglobulin, Fibrinogen, Fibringlobulin und Myosin. Alkohol fällt die Globuline leichter als die Albumine und koaguliert sie auch schneller, wenn sie mit Alkohol in Berührung bleiben. — Serumglobulin, auch Paraglobulin oder fibrinoplastische Substanz genannt, findet sich in Blut, Lymphe, Transsudaten und im pathologischen eiweißhaltigen Harne.

Ueber die Konstitution der Proteine und über Polypeptide.

Wie aus den obigen Konstitutionsformeln der Spaltungsstücke der Eiweißstoffe zu ersehen ist, müssen in den Molekülen der Proteine Kerne vorhanden sein, welche zum Teil der aliphatischen Reihe (Glykokoll, Alanin, Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure), zum Teil der karbozyklischen Reihe (Phenylalanin, Tyrosin) und endlich auch der heterocyklischen Reihe (Histidin, Prolin, Tryptophan) ange-

hören. Nicht alle diese Kohlenstoffkerne werden in jedem Protein gefunden. Die verschiedenen Eiweißstoffe unterscheiden sich in erster Linie von einander durch einen verschiedenen Gehalt an einem und demselben Spaltungsprodukte, z. B. an Glykokoll, Leucin, Lysin, Arginin, Histidin oder Tyrosin, wie die unten stehende Tabelle zeigt.

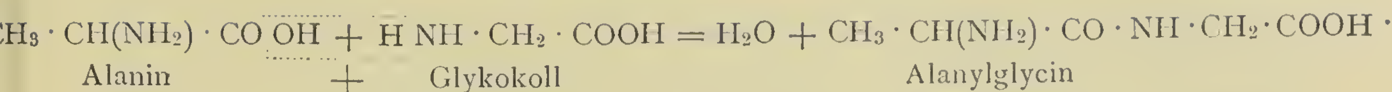
Emil Fischer[1]) hat eine Methode, die »Estermethode«, ausgearbeitet, mit Hilfe deren verschiedene der durch Hydrolyse der Proteine mit Mineralsäuren entstehenden Aminosäuren fast quantitativ von einander getrennt werden können. Zur völligen Spaltung der verschiedenen Eiweißstoffe tierischen oder pflanzlichen Ursprungs löst man sie in rauchender Salzsäure von 1,19 spez. Gew. (500 g Eiweiß + 1500 ccm Säure), eventuell unter Erwärmen auf dem Wasserbade, auf und kocht diese Lösung 6 Stunden auf einem Baboblech unter Rückfluß. Als ein Zeichen für die beendete Hydrolyse sieht man den negativen Ausfall der Biuretprobe an. Die so erhaltene hydrolysierte Flüssigkeit, welche dunkelviolett oder dunkelbraun gefärbt ist, wird, falls sie ungelöste Massen, nämlich Melaninsubstanzen, enthalten sollte, abfiltriert und nach der erwähnten Estermethode weiter verarbeitet. Je 100 g der folgenden, vorher bei 100° ausgetrockneten Proteine lieferten die folgenden Mengen von Abbauprodukten und zwar in Grammen ausgedrückt:

	Serum-albumin:	Eier-albumin: (krist.):	Oxyhämo-globin (krist.):	Caseïn (Kuh):	Edestin[2]) (krist.):
Glykokoll	0	0	0	0	1,20
Alanin	2,68	2,10	4,02	0,9	4,50
Valin				1,0	+
Leucin	20,00	6,1	27,82	10,5	15,5
α-Pyrrolidinkarbonsäure	1,04	2,25	2,25	3,1	2,3
Phenylalanin	3,08	4,4	4,06	3,2	3,9
Glutaminsäure	1,52	8,0	1,66	10,7	17,2
Asparaginsäure	3,12	1,5	4,25	1,2	2,9
Cystin	2,30	0,2	0,3	0,02	
Serin	0,60		0,54	0,43	0,4
Oxy-α-Pyrrolidinkarbonsäure			1,0	0,23	
Tyrosin	2,10	1,1	1,28	4,50	2,30
Lysin		2,15	4,1	5,80	
Histidin		0	10,5	2,59	
Arginin		2,14	5,2	4,84	
Tryptophan	+		+	1,50	+

Aus diesen durch Hydrolyse hervorgehenden Spaltstücken müssen die Moleküle der betreffenden Proteine aufgebaut sein! — E. Fischer nennt »Polypeptide« solche Verbindungen, welche durch eine amid- oder imidartige Verkettung von Aminosäuren entstehen, so daß die Aminogruppe der einen Aminosäure sich mit dem Carboxyl der gleichen oder einer anderen Aminosäure unter Wasseraustritt verbindet:

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 151 und 412 (1901). Vgl. ferner E. Fischer, »Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine« (1899—1906), sowie E. Abderhalden, »Handbuch der Biochemie« 1, 356.

[2]) Ein aus Baumwollsamen erhältlicher Eiweißkörper.



$CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot CO\,OH + H\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH = H_2O + CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$

Alanin + Glykokoll — Alanylglycin

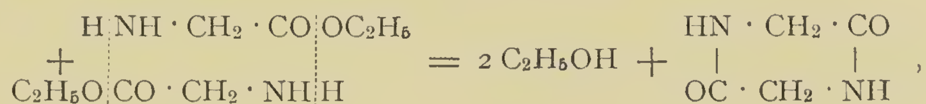
Nach der Anzahl der in den Molekülen der Peptide vorhandenen Aminosäurereste unterscheidet man sie als Di-, Tri-, Tetra- . . . Poly-Peptide:

$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$ = Glycylglycyn, ein Dipeptid.

$H_2N \cdot CH(CH_3) \cdot CO \cdot NH \cdot CH(C_4H_9) \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$ = Alanylleucylglycin, ein Tripeptid.

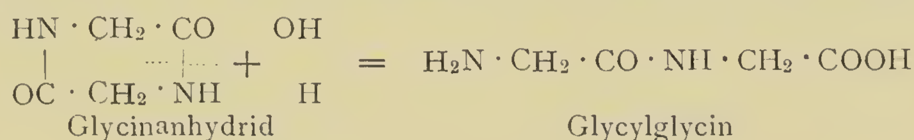
In der Bezeichnung »Peptid« ist das alte Wort Pepton verwertet, indem E. Fischer von der Ansicht ausgeht, daß die natürlichen, durch Hydrolyse von Eiweißstoffen hervorgehenden Peptone ein bisher untrennbares Gemisch von Polypeptiden darstellen. Nicht nur die Polypeptide, sondern die nativen Eiweißstoffe selbst dürften durch eine amidartige Kondensation von Aminosäuren entstehen. Die Zahl der künstlich dargestellten Polypeptide ist schon eine recht stattliche. Es sind im Wesentlichen drei verschiedene Methoden, mit Hilfe deren Polypeptide künstlich dargestellt werden können (E. Fischer).

1. Aus den Aminosäureestern, die mit kaltem Wasser in die Anhydride von Polypeptiden oder in Diketopiperazine übergehen; z. B. entsteht aus Glykokollaethylester das Glycinanhydrid:



$$\begin{matrix} H\,NH \cdot CH_2 \cdot CO\,OC_2H_5 \\ + \\ C_2H_5O\,CO \cdot CH_2 \cdot NH\,H \end{matrix} = 2\,C_2H_5OH + \begin{matrix} HN \cdot CH_2 \cdot CO \\ | \qquad\quad | \\ OC \cdot CH_2 \cdot NH \end{matrix},$$

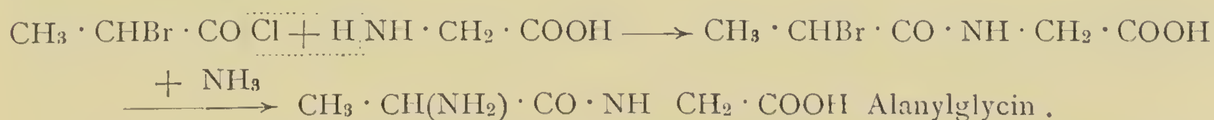
Das unter dem Einflusse von verdünntem Alkali unter Aufnahme von 1 Mol. Wasser in das Dipeptid Glycylglycin übergeht:



$$\begin{matrix} HN \cdot CH_2 \cdot CO \\ | \qquad\quad | \\ OC \cdot CH_2 \cdot NH \end{matrix} + \begin{matrix} OH \\ \\ H \end{matrix} = H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$$

Glycinanhydrid — Glycylglycin

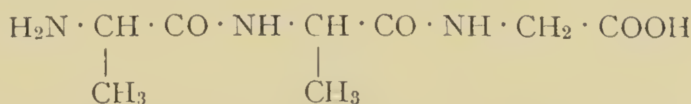
2. Aus Aminosäuren durch Verkuppelung mit halogenisierten Säurechloriden oder Säurebromiden und darauf folgende Behandlung mit Ammoniak. So entsteht aus Glycin und Brompropionylchlorid zunächst Brompropionylglycin, das mit Ammoniak unter Austausch des Bromatoms gegen NH_2 in Alanylglycin übergeht:



$$CH_3 \cdot CHBr \cdot CO\,Cl + H\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH \longrightarrow CH_3 \cdot CHBr \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$$

$$\xrightarrow{+\,NH_3} CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot CO \cdot NH\;CH_2 \cdot COOH \text{ Alanylglycin}.$$

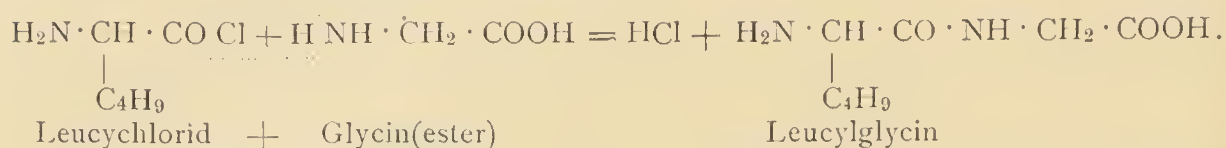
Durch erneute Einwirkung von Brompropionchlorid und darauf folgende Ammoniakbehandlung läßt sich aus dem Dipeptid das Tripeptid Alanylalanylglycin



$$H_2N \cdot CH(CH_3) \cdot CO \cdot NH \cdot CH(CH_3) \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$$

darstellen. Nach diesem Prinzip ist also eine Verlängerung der Kette auf der Seite der Aminogruppe möglich.

3. Eine Verlängerung auf der Seite der Karboxylgruppe hat E. Fischer in der Weise verwirklichen können, daß die Aminosäuren oder Polypeptide mittels Phosphorpentachlorid in Aminosäurechloride oder Polypeptidchloride übergeführt werden, die sich mit Aminosäuren und Polypeptiden, besonders aber leicht mit deren Estern, verkuppeln lassen:



Eigenschaften der Polypeptide. Die meisten Polypeptide sind gerade so wie die Peptone in Wasser leicht löslich; bemerkenswert ist hierbei, daß auch die Peptide von schwer löslichen Aminosäuren wie das Leucyltyrosin in Wasser außerordentlich leicht löslich sind. In absolutem Alkohol sind fast alle Polypeptide unlöslich. Mineralsäuren und Alkalilaugen lösen die Polypeptide leicht auf, indem sie damit Salze bilden. — Im Gegensatze zu den Aminosäuren schmecken die Polypeptide nicht süß, sondern schwach bitter oder fade. — Wie Aminosäuren bilden auch die Polypeptide mit absolut alkoholischer Salzsäure Ester. — Verschiedene Polypeptide wie das Diglycylglycin geben die Biuretprobe. — Hydrolyse. In Bezug auf Hydrolyse verhalten sich die künstlich erhaltenen Polypeptide sehr ähnlich den Peptonen und eigentlichen Eiweißsubstanzen, denn 5stündiges Kochen mit rauchender Salzsäure genügt auch bei den Polypeptiden zu ihrem völligen Zerfall in die Aminosäuren, aus welchem sie aufgebaut sind. — Verdauungsfermente. Interessant ist das Verhalten der Polypeptide gegen Verdauungsfermente, insbesondere gegen Pankreassaft; viele, aber nicht alle Polypeptide werden hierdurch hydrolysiert, und zwar ist die Konstitution der Peptide von großer Bedeutung für deren Spaltbarkeit. In der Regel werden nur diejenigen Kombinationen gespalten, welche aus den in der Natur vorkommenden optisch aktiven Aminosäuren gebildet sind. Mit Hilfe des Pankreassaftes ist es also möglich, die Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen zu scheiden. Racemkörper werden hierbei asymetrisch gespalten. Die Tatsache, daß die Polypeptide durch rauchende Salzsäure und durch dieselben Enzyme oder Fermente hydrolysiert werden, durch welche auch die Moleküle der natürlichen Proteinstoffe aufgespalten werden, spricht durchaus zugunsten der Anschauung, daß bei den Proteinen Aminosäureverkettungen derselben Art vorkommen wie bei den künstlich dargestellten Polypeptiden. Diese Ansicht findet eine wesentliche Stütze in dem Vorkommen von Polypeptiden unter den Abbauprodukten der Eiweißstoffe, ein Befund, der gewissermaßen das Gegenstück zu den erwähnten Synthesen der Polypeptide bildet. E. Fischer und E. Abderhalden haben als Erste unter den Abbauprodukten des Seidefibroins durch partielle Hydrolyse die Anhydride von zwei Dipep-

tiden, nämlich das Glycyl-d-alaninanhydrid und Glycyl-l-tyrosinanhydrid, erhalten und die Identität derselben mit den künstlich dargestellten Substanzen nachgewiesen.

Reaktionen der natürlichen Eiweissstoffe. Die Lösungen der Eiweißstoffe in Wasser sind entsprechend der kolloidalen Natur der Proteine keine echten, sondern kolloidale Lösungen, also sehr feine Suspensionen der Eiweißhydrosole; diese können unter den verschiedenartigsten Bedingungen ausgeflockt, in Eiweißhydrogele übergeführt werden. Die Ausflockung der Eiweißhydrogele erfolgt beispielsweise durch Zusatz bestimmter Salze, Elektrolyte, oder von Alkohol oder durch Erhitzen.

Man kennt eine große Anzahl allgemeiner Reaktionen auf Eiweißstoffe. Man pflegt sie in zwei Gruppen einzuteilen, von welchen die eine Gruppe die Fällungsreaktionen, die andere die Farbenreaktionen umfaßt.

I. Fällungsreaktionen.

1. Mineralsäuren. Konzentrierte Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure fällen Eiweiß aus seinen Lösungen; die Niederschläge sind im Ueberschusse der Säure, besonders beim Erwärmen, mehr oder weniger leicht löslich.

2. Neutralsalze. Sättigt man eine wässerige Eiweißlösung mit Ammoniumsulfat, so fällt alles Eiweiß unverändert aus. — Auch durch Chlornatrium, Natriumsulfat und Magnesiumsulfat können die Eiweißstoffe bei hinreichender Konzentration aus ihren Lösungen ausgesalzen werden. Bei Gegenwart von Essigsäure oder Salzsäure können auch Natriumsulfat und Chlornatrium allgemeine Fällungsreagenzien für Eiweißstoffe werden, nämlich dann, wenn diese Neutralsalze bis zur Sättigung der Eiweißlösung eingetragen werden.

3. Schwermetallsalze. Neutrales und basisches Bleiacetat, Quecksilberchlorid, Kupfersulfat sowie Eisenchloridlösung fällen Eiweißlösungen aus, und zwar sind die Niederschläge im Ueberschuß des Fällungsmittels zum Teil löslich. Auf der Fällbarkeit durch Eiweiß beruht die Anwendung des letzteren als Gegenmittel bei Vergiftung durch Schwermetallsalze.

4. Alkohol fällt die neutralen oder schwach sauren Eiweißlösungen vollständig aus, besonders wenn diese eine genügende Menge Neutralsalze enthalten.

5. Alkaloidreagenzien. Die meisten allgemeinen Alkaloidreagenzien fällen Eiweiß aus seinen Lösungen aus; zu diesen gehören Quecksilberjodid-jodkalium, Wismutjodid-jodkalium, in beiden Fällen bei Gegenwart von Salzsäure, ferner Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure bei Gegenwart einer freien Mineralsäure, Gerbsäure in Verbindung mit Essigsäure, Pikrinsäure in Verbindung mit Citronensäure.

II. Farbenreaktionen.

1. Die Xanthoproteinreaktion. Erwärmt man eine Eiweißlösung mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure, so färbt sie sich gelb und nimmt alsdann eine orangerote Färbung an, wenn man Ammoniak oder Natronlauge im Ueberschusse hinzufügt.

Die aromatischen Komplexe der Eiweißstoffe werden durch die Salpetersäure unter Bildung gelb gefärbter Nitroderivate nitriert. Nach E. Rohde[1]) ruft die Skatolaminoessigsäure in Salpetersäure eine intensiv gelbe Färbung hervor, die mit überschüssiger Natronlange in Orange umschlägt; hiernach beruht die Xanthoproteïnreaktion wenigstens zum Teil auf der im Eiweißmolekül vorkommenden Indolgruppe (Tryptophan).

3. Die Millon'sche Probe. Millon'sches Reagens gibt mit Eiweißlösungen einen weißen, flockigen Niederschlag, der sich beim Kochen mit dem Reagens rot färbt, und auch die Flüssigkeit nimmt hierbei eine mehr oder weniger rote Färbung an. Auch feste koagulierte, also denaturierte, Eiweißstoffe werden beim Erhitzen mit Millons Reagens rot gefärbt.

Diese Probe beweist das Vorhandensein einer einwertigen Phenolgruppe im Eiweißmolekül und ist höchst wahrscheinlich auf den Tyrosinrest zurückzuführen. Alle einwertigen Phenole, wie die Carbolsäure, die Kresole, Salicylsäure, das Tyrosin geben nämlich die Millon'sche Probe.

3. Die Biuretprobe. Versetzt man eine Eiweißlösung erst mit Kali- oder Natronlauge, dann tropfenweise mit einer stark verdünnten Kupfersulfatlösung, so färbt sich das Gemisch je nach dem Eiweiß- und Kupfergehalt rötlich, rotviolett bis violettblau.

Die Biuretprobe ist für Eiweißstoffe nicht charakteristisch, da es verschiedene Diamide gibt, welche die Probe sehr deutlich geben (Hugo Schiff[2]). Zur Hervorrufung der Reaktion bedarf es mindestens zweier Carbamidgruppen, $(.CO \cdot NH_2)$-gruppen, welche im Molekul direkt unter sich verbunden oder an ein einziges Atom Kohlenstoff oder Stickstoff gebunden, oder aber durch eine oder mehrere Imidocarbonylgruppen $(-CO \cdot NH-)$ in offener Kette vereinigt sind. Folgende Verbindungen, die sämtlich diese Bedingungen erfüllen, geben die Biuretprobe:

Oxamid $H_2N \cdot CO \cdot CO \cdot NH_2$, Malondiamid $H_2N \cdot CO \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH_2$,
Oxalyldiuriid $H_2N \cdot CO \cdot NH \cdot CO \cdot CO \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2$,
Isosuccinyldiamid $CH_3 \cdot CH \cdot (CO \cdot NH_2)_2$,
Biuret $H_2N \cdot CO \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2$.

Ein einziges freies Amidocarbonyl $(-CO \cdot NH_2)$ ist zur Hervorrufung der Biuretprobe nicht genügend; wohl aber kann ein Amidocarbonyl durch die Gruppen $(-CS \cdot NH_2)$ oder $\left(-C\begin{smallmatrix} \diagup NH \\ \diagdown NH_2 \end{smallmatrix}\right)$ ersetzt sein; z. B. geben das Thiuret $H_2N \cdot CS \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2$ und das Dicyandiamidin $H_2N(NH)C \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2$ die Biuretreaktion (H. Schiff[3]).

Auch beide Amidocarbonylgruppen können durch die $\left(-C\begin{smallmatrix} \diagup NH \\ \diagdown NH_2 \end{smallmatrix}\right)$gruppe er-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 170 (1905).

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 29, 298 (1896).

[3]) Liebigs Annal. d. Chem. 299, 236 (1898).

setzt sein; wie dies bei dem die Biuretprobe gebenden Biguanid $NH = [C(NH)NH_2]_2$ der Fall ist.

4. Die Probe von Adamkiewicz. Versetzt man eine Eiweißlösung mit einer Mischung aus 1 Vol. konzentrierter Schwefelsäure und 2. Vol. Eisessig, so färbt sie sich, kalt langsam, beim gelinden Erwärmen aber rasch, rotviolett. Nach Hopkins und Cole gelingt die Reaktion auch mit glyoxylsäurehaltigem Eisessig[1]). Man versetzt die verdünnte wässerige Glyoxylsäurelösung mit der betreffenden Eiweißlösung oder mit Eiweiß in Substanz und läßt dann an der Seite des Reagenzglases vorsichtig konz. Schwefelsäure herunterfließen. Die Farbe tritt an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten auf.

5. Die Probe mit p-Dimethylaminobenzaldehyd[2]). In einem Reagenzglase bringt man zu der betreffenden Eiweißlösung oder zu der Aufschwemmung des Eiweißstoffes in Wasser 5—10 Tropfen einer 5%igen, schwach schwefelsauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd und läßt alsdann unter häufigem Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure bis zum Auftreten der rotvioletten oder dunkelvioletten Färbung zufließen.

Diese Reaktion kommt, wie es scheint, der Indolgruppe vom Eiweiß zu; Tryptophan gibt wenigstens die Probe sehr stark. (E. Rohde)[3]). Positiv fällt die Probe aus bei Caseïn, Edestin, Protalbumose, Ovalbumin und Serumalbumin, negativ aber bei Glutin (Leim) und dem Protamin, also bei solchen Proteinen, die keine Indolgruppe enthalten.

Bei sehr verdünnten Eiweißlösungen führt man zweckmäßig eine Schichtprobe aus, indem man konzentrierte Schwefelsäure, in welcher im Verhältnisse von 1 : 100 der p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst ist[4]), der betreffenden Eiweißlösung unterschichtet; man erhält dann an der Grenze der beiden Flüssigkeitsschichten einen deutlichen Farbenring. In dieser Weise ausgeführt, ist die Aldehydprobe außerordentlich empfindlich; z. B. läßt sich mit derselben noch 0,015% Caseïn nachweisen.

6. Die Diazoreaktion. Man versetzt die Eiweißlösung erst mit einem Ueberschusse von Sodalösung, dann mit 3—5 ccm einer unmittelbar vorher bereiteten sodaalkalischen Lösung von einigen Centigrammen Diazobenzolsulfosäure. Nach Verlauf von längstens 3 Minuten, gewöhnlich aber sofort, tritt eine dunkelkirschrote Färbung auf, die selbst beim Verdünnen mit viel Wasser ihren roten Ton behält und nicht gelbstichig wird. Diese Probe zeigt Histidin und Tyrosin an

---

[1]) Glyoxylsäure $C_2H_4O_4 = CH(OH)_2 \cdot COOH$.

[2]) p-Dimethylaminobenzaldehyd =
```
     C·N(CH3)2
    //\
  HC   CH
   |   ||
  HC   CH
    \\//
     C·CHO
```

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 161 (1905).

[4]) Diese Lösung ist stets frisch zu bereiten.

und tritt daher nur bei denjenigen Eiweißkörpern auf, aus welchen Histidin und Tyrosin isoliert worden sind, während sie bei anderen Proteinen, in denen diese beiden Eiweißspaltkörper nicht aufgefunden wurden, versagt. H. Pauly[1]).

Bereitung der Diazobenzolsulfosäure. 2 g fein gepulverte Sulfanilsäure werden mit 3 ccm Wasser und 2 ccm konzentrierter Salzsäure zu einem Brei angeschüttelt, dann in kleinen Portionen innerhalb einer Minute mit einer frisch bereiteten Lösung von 1 g Kaliumnitrit in 1—2 ccm Wasser versetzt, wobei nach jedem Zusatz mit kaltem Wasser gekühlt wird. Die Sulfanilsäure geht größtenteils rasch in Lösung und an ihre Stelle tritt alsbald ein dichter, weißer, kristallinischer Niederschlag von Diazobenzolsulfosäure, der nach einigen Minuten abgesaugt und mit wenig Wasser ausgewaschen wird. Unveränderte Sulfanilsäure beeinträchtigt die Reaktion in keiner Weise.

Der Bence-Jones'sche Eiweisskörper des Harns.

Bence Jones fand im Jahre 1847 im Harne eines Kranken einen eigentümlichen Eiweißkörper, der sich von den gewöhnlich im Harne vorkommenden Eiweißstoffen dadurch unterschied, daß er sich beim Erwärmen des betreffenden Harns auf nur 50—60° ausschied und beim Aufkochen wieder löste, um alsdann beim Erkalten wieder aufzutreten. Dieser eigentümliche Eiweißkörper, nach seinem Entdecker »Bence Jones'scher Eiweißkörper« genannt, ist dann von verschiedenen Autoren, in seltenen Fällen meist bei Kranken mit Knochenmarkveränderungen im Harne aufgefunden worden. In den letzten Jahren wurde er besonders von Magnus-Levy[2]) eingehend untersucht, dem es auch geglückt ist, den Bence Jones'schen Eiweißkörper im kristallisierten Zustande darzustellen. Nach Magnus-Levy zeigt der im Harne gelöste Eiweikörper die folgenden Eigenschaften und gibt die folgenden Reaktionen.

1. Beim Erwärmen auf 60—65° erfolgt Ausscheidung, bei 75—100° teilweise Klärung und bei Abkühlung wieder stärkere Trübung.

2. Salpetersäure von 25% fällt ihn bereits in der Kälte; Salzsäure von 12,5% verhält sich gerade so. In der Siedehitze ist der entstandene Niederschlag teilweise löslich, um beim Abkühlen wieder aufzutreten. — Essigsäure fällt nicht, nach genügendem Zusatze auch nicht in der Wärme.

3. Millon's Reagens färbt die ausgefällten Flocken beim Erwärmen schön rot.

4. Die Flocken geben die Biuretprobe: Rotviolettfärbung.

5. Pikrinsäure fällt einen reichlichen Niederschlag aus, der bei 100° nur in Spuren löslich ist.

6. Essigsäure-Ferrocyankalium gemisch erzeugt nur einen geringen Niederschlag, der erheblich stärker wird, wenn man den Harn vorher stark verdünnt hat.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 508 (1904).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 200 (1900).

7. Vollständige Ausfällung durch Zusatz von 2 Vol. Alkohol von 90% oder von 2 Vol. gesättigter Ammoniumsulfatlösung zum Harn.

Ebenso vollständig ist die Fällung durch Essigsäure unter Zusatz gesättigter Kochsalzlösung.

8. Der Bence-Jones'sche Eiweißkörper dialysiert nicht und scheidet sich auch bei tagelangem Dialysieren nicht aus.

Nach Abderhalden und Rostoski[1]) besitzt der Bence-Jones'sche Eiweißkörper qualitativ genau dieselbe Zusammensetzung wie die übrigen bis jetzt näher untersuchten Eiweißarten, indem sich mit Hilfe der Estermethode Glykokoll, Alanin, Leucin, α-Pyrrolidinkarbonsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Phenylalanin nachweisen ließen. Ferner wurde der Tyrosingehalt festgestellt und außerdem die Diaminosäuren Lysin, Arginin und Histidin nachgewiesen. Der Bence-Jones'sche Eiweißkörper ist ein wirklicher Eiweißstoff, der nach seiner Zusammensetzung dem Serumalbumin und Serumglobulin sehr nahe steht. Die Frage muß zunächst offen gelassen werden, ob der Bence-Jones'sche Eiweißkörper ein einheitliches Produkt oder ein Gemisch darstellt (Abderhalden und Rostoski). Spritzt man einem Kaninchen Harn mit Bence-Jones'schem Eiweiß oder eine entsprechende Menge des ausgefällten und wieder aufgelösten Eiweißkörpers ein, so findet man in dem Kaninchenurin weder Eiweiß noch Albumosen oder Peptone. Dieses Resultat spricht zu Gunsten der Annahme, daß es sich bei dem Bence-Jones'schen Eiweißköiper um ein wenig abgebautes Eiweiß handelt, denn es werden injizierte Albumosen und Peptone vom Kaninchen mit dem Harn wieder ausgeschieden, während Serumeiweiß und andere native Eiweißstoffe in ziemlich großer Menge injiziert werden können, ohne daß sie die Nieren passieren.

Der Nachweis von Eiweiss im Harne.

Nach Ansicht verschiedener Forscher können Spuren von Eiweiß im normalen Harne des Menschen vorkommen. K. Mörner nimmt sogar an, daß sich Eiweiß regelmäßig als normaler Bestandteil im Menschenharne vorfindet, und zwar in Mengen von 20—80 mg im Liter Harn. Unter pathologischen Verhältnissen ist der Gehalt des Harns an Eiweiß in den meisten Fällen kleiner als 5 pro mille, selten erreicht er die Höhe von 10‰ und äußerst selten die von 50‰ und darüber. Meist sind es Serumalbumin und Serumglobulin, die sich im pathologischen eiweißhaltigen Harne vorfinden; doch kommen mitunter auch Albumosen, Peptone (?) und Hämoglobin darin vor. Die in Frage kommenden Eiweißstoffe finden sich im Harne stets im gelösten Zustande vor und können daher niemals einen Bestandteil von Harnsedimenten ausmachen. In der Tagesmenge Harn kann eine Eiweißmenge von weniger als 1 g, aber auch eine solche von 30 g und darüber enthalten sein.

Man filtriere den Harn vor dem Anstellen der im Folgenden

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 125 (1905).

beschriebenen Eiweißreaktionen und führe die sämtlichen Proben mit dem absolut klaren Filtrate aus; auf jeden Fall begnüge man sich nicht mit einer Reaktion auf Eiweiß, besonders nicht in zweifelhaften Fällen.

1. **Die Kochprobe.** Man erhitzt etwa 10 ccm des filtrierten, klaren, sauer reagierenden Harns zum Sieden; entsteht ein Niederschlag, so fügt man vorsichtig 1 bis 2 bis 3 Tropfen verdünnte Essigsäure (25%ige) hinzu und kocht nach Zusatz von jedem Tropfen Essigsäure nochmals auf. Bleibt hierbei ein weißer, flockiger Niederschlag ungelöst, so enthält der Harn koagulables Eiweiß. Löst sich aber der beim Kochen des Harns entstandene Niederschlag in Essigsäure vollkommen klar auf, so hat er ausschließlich aus Phosphaten bestanden. — Reagiert der zu untersuchende Harn alkalisch, so muß er vor dem Aufkochen mit Essigsäure schwach angesäuert werden. — Ein salzarmer Harn muß vor dem Aufkochen mit etwa 1/10 Vol. gesättigter Kochsalzlösung oder dem gleichen Volumen gesättigter Natriumsulfatlösung versetzt werden.

Bleibt ein sauer reagierender Harn, auch nach Zusatz von Kochsalzlösung, beim Kochen vollkommen klar, zeigt sich also weder ein Niederschlag, noch eine Trübung oder Opaleszenz, so enthält der betreffende Harn kein durch Aufkochen koagulierbares Eiweiß. Der Harn kann aber Albumosen und Peptone enthalten, welche beim Kochen des Harns nicht ausgefällt werden.

2. **Die Heller'sche Schichtprobe.** Ueberschichtet man in einem Reagensglase einige Kubikzentimeter konzentrierte Salpetersäure (Dichte 1,4) vorsichtig mit dem zuvor filtrierten klaren Harne, so bildet sich an der Berührungsschicht der beiden Flüssigkeiten eine scharf begrenzte weiße Trübung, wenn der Harn eiweißhaltig ist. Das Ueberschichten gelingt meist leicht, wenn man das Reagensglas mit der Salpetersäure möglichst wagrecht hält und den zu untersuchenden Harn aus einem, ebenfalls wagrecht zu haltenden Reagensglase allmählich zufließen läßt. Beachtenswert ist, daß man beim Anstellen der Hellerschen Probe mit jedem normalen Harne einen, von Indigofarbstoffen herrührenden, roten oder rotvioletten durchsichtigen Ring erhält, der mit dem weißlichen trüben, also undurchsichtigen, Eiweißringe schwerlich verwechselt werden kann.

Bemerkungen. Aus Harnen, welche reich an harnsauren Salzen (Uraten) sind, kann durch die Salpetersäure Harnsäure gefällt werden; der »Harnsäurering« liegt freilich nicht an der Berührungsschicht der beiden Flüssigkeiten, sondern meist etwas höher. Um eine Verwechslung mit Harnsäure von vornherein auszuschließen, verdünnt man einen uratreichen Harn vor dem Anstellen der Heller'schen Probe mit 2 Vol. Wasser. Da die Empfindlichkeit der Hellerschen Probe außerordentlich groß ist, so wird die Verdünnung des Harns in den meisten Fällen nichts schaden.

Harzsäuren, welche z. B. nach innerlicher Darreichung von Terpentin, Copaivabalsam, Tolubalsam und anderen Balsamen im Harne vorkommen, geben beim Anstellen der Hellerschen Schichtprobe gleichfalls eine weiße Trübung und

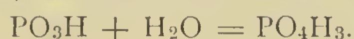
können daher Eiweiß vortäuschen. Fügt man aber zu der betreffenden Probe Aether und schüttelt vorsichtig um, so verschwindet die weiße Trübung, falls sie ausschließlich durch freie Harzsäuren hervorgerufen war; sie bleibt aber bestehen, wenn Eiweiß vorhanden ist. — Aus konzentrierten, sehr harnstoffreichen Harnen kann durch die hochkonzentrierte Salpetersäure unter Umständen salpetersaurer Harnstoff gefällt werden, ein Fall, der freilich sehr selten vorkommen dürfte. Eine Verwechslung mit der durch Eiweiß bedingten Trübung wird in diesem Falle kaum vorkommen, denn der salpetersaure Harnstoff scheidet sich in glänzenden Kristallen aus; es wird eine derartige Ausscheidung überhaupt nicht erfolgen, wenn man den Harn vor dem Anstellen der Hellerschen Probe mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. — Mit Hilfe der Hellerschen Probe lassen sich noch 0,002% Eiweiß im Harn nachweisen. Auch Albumosen geben die Probe.

3. **Die Probe mit Essigsäure-Ferrocyankalium** (Boedeker). Man versetzt ca. 10 ccm klaren Harn erst mit 10—15 Tropfen Essigsäure[1]), dann tropfenweise mit Ferrocyankaliumlösung (1:20) und zwar so, daß man einen Ueberschuß der letzteren zu vermeiden sucht. Enthält der Harn Eiweiß, so entsteht ein weißer, flockiger Niederschlag oder wenigstens eine Trübung, wenn es sich nur um Spuren von Eiweiß handelt. Auch Albumosen werden durch Essigsäure-Ferrocyankalium gefällt, aber beim Erwärmen löst sich der Albumosenniederschlag wieder auf; es darf nur gelinde erwärmt werden. Sehr empfindliche Eiweißprobe.

Trübt sich der Harn auf Zusatz der Essigsäure, so muß die, meist durch Mucin bedingte Trübung durch Filtration durch ein Doppelfilter zuerst beseitigt werden.

4. **Die Probe mit Metaphosphorsäure.** Man versetzt den klaren Harn tropfenweise mit einer frisch bereiteten Lösung von Metaphosphorsäure[2]); bei Gegenwart von Eiweiß entsteht ein weißer, flockiger Niederschlag. Auch Albumosen werden durch Metaphosphorsäure ausgefällt. Die Probe ist nicht so empfindlich wie die unter 2. und 3. angegebenen Proben.

5. **Die Probe mit Sulfosalicylsäure**[3]). Man versetzt den klaren Harn mit einer 20%igen wässerigen Lösung von Sulfosalicylsäure; bei Vorhandensein von Eiweiß trübt sich der Harn, oder es entsteht ein weißer Niederschlag. Auch die Albumosen werden durch Salicyl-



[1]) Man verwende die verdünnte Essigsäure, Acidum aceticum dilutum, des »Arzneibuches«, welche 30% $C_2H_4O_2$ enthält.

[2]) Metaphosphorsäure geht in wässeriger Lösung allmählich in gewöhnliche Phosphorsäure über, welche Eiweiß nicht ausfällt:

$$PO_3H + H_2O = PO_4H_3.$$

Man verwende daher für diese Eiweißprobe Metaphosphorsäure in Substanz, oder die frisch bereitete wässerige Lösung der Säure.

[3]) 5-Sulfosalicylsäure, $C_7H_6O_6S$, $(HO)\,C_6H_3\,(SO_3H)\,(COOH)$, entsteht bei ½stündigem Erwärmen von 10 Tln. Salicylsäure mit 50 Tln. konz. Schwefelsäure, im siedenden Wasserbade; sie kristallisiert bei langsamem Verdunsten der wässerigen Lösung in langen, dünnen Nadeln vom Schmp. 120° und ist in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich. Umkristallisieren aus gesättigter Kochsalzlösung oder aus sehr wenig Wasser.

sulfosäure gefällt und beim Erwärmen ebenso leicht wieder gelöst. Sehr empfindliche Eiweißprobe.

6. **Die Probe von Spiegler.** Man bringt etwa 5 ccm Spiegler'sches Reagens in ein Probierröhrchen und läßt den zu untersuchenden Harn aus einer Pipette längs der Wand des Röhrchens vorsichtig herabfließen. Enthält der Harn Eiweiß, so entsteht an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten eine weiße Trübung, ein weißer Ring. Die Empfindlichkeit der Probe ist sehr groß.

Herstellung des Reagenses. Eine Lösung von 8 g Quecksilberchlorid, 4 g Weinsäure und 20 g Glycerin in 200 ccm Wasser.

In sehr chlorarmen Harnen versagt das Spiegler'sche Reagens. A. Jolles [1]) empfiehlt das folgende modifizierte Reagens: 10 g Quecksilberchlorid, 20 g Bernsteinsäure, 20 g Chlornatrium, gelöst in 500 ccm Wasser. Dieses Reagens läßt Eiweiß noch bei einer Verdünnung von 1 : 120 000 erkennen und zwar auch in kochsalzarmen, resp. kochsalzfreien Harnen; es werden durch dasselbe Serumalbumin, Globulin und auch Albumosen gefällt. — Jodhaltiger Harn bildet mit Spiegler's Reagens einen Ring von Quecksilberjodid.

Nach Jolles überschichtet man 5 ccm klaren, mit 1 ccm 30%iger Essigsäure versetzten Harn mit 4 ccm des nach Jolles hergestellten Reagensgemisches. Bei einem Eiweißgehalt des Harns bildet sich sofort ein scharfer weißlicher Ring. Bei Spuren von Eiweiß entsteht der Ring nach ungefähr 1 Minute.

7. **Die Probe mit Trichloressigsäure** [2]). Nach Raabe bringt man in einem engeren Probierröhrchen zu 1 ccm des klar filtrierten Harns ein Stückchen Trichloressigsäure; bei Anwesenheit von Eiweiß entsteht an der Grenze zwischen Harn und der entstandenen Säurelösung eine scharf abgegrenzte trübe Zone. Normaler Harn gibt keine ähnliche Reaktion. Harnsäurereicher Harn muß vor dem Anstellen der Probe mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt werden, um eine Trübung durch Harnsäure zu verhindern. — Man kann auch den betreffenden klaren Harn mit einer gesättigten wässerigen Lösung von Trichloressigsäure versetzen. — Die Probe ist so empfindlich wie die Heller'sche Probe und die Probe mit Metaphosphorsäure.

8. **Die Probe mit β-Naphtalinsulfosäure** (Riegler). Man löst 0,1 g β-Naphtalinsulfosäure unte Umschütteln in 10 ccm destilliertem Wasser und gießt zu der klaren Lösung 5 bis 6 ccm des klaren Harns. Bei einem Eiweißgehalt des Harns entsteht eine weiße Trübung oder ein Niederschlag. Sehr empfindliche Probe, mittels deren sich Eiweiß noch in Verdünnungen von 1 : 40 000 nachweisen läßt. — Auch Albumosen werden durch das Reagens gefällt.

9. **Die Probe von Esbach.** Vgl. Quantitative Bestimmung des Eiweißes im Harne.

Man versetzt den klaren filtrierten Harn mit dem gleichen Volumen Esbach'schem Reagens und bewegt das Reagensglas einige Male hin und

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 21, 306 (1895/96).

[2]) Trichloressigsäure = $CCl_3 \cdot COOH$.

her. Bei Gegenwart von Eiweiß bildet sich ein weißliches Koagulum.

Beurteilung. Wie bereits darauf hingewiesen wurde, darf man sich bei der Untersuchung eines Harns auf einen etwaigen Eiweißgehalt niemals mit einer einzigen Reaktion begnügen. Man muß, besonders in zweifelhaften Fällen, die Kochprobe, die Heller'sche Probe, die Esbach'sche und die Ferrocyankalium-Essigsäureprobe anstellen. Durch die Kochprobe allein können etwa vorhandene Albumosen übersehen werden, welche dann durch die Heller'sche Probe sowie die Ferrocyankaliumprobe aufgefunden werden.

Es muß ferner in Betracht gezogen werden, daß jeder normale Harn minimale Spuren von Eiweiß enthält (K. Mörner, s. o.), oder wohl richtiger gesagt, enthalten kann, und daß aus diesem Grunde Reagenzien von allzugroßer Empfindlichkeit auszuschalten sind. Eine sehr beliebte klinische Eiweißprobe ist die Heller'sche Probe, welche für die Praxis hinreichend empfindlich ist. Wenn beim Anstellen dieser Probe innerhalb 3 Minuten keine positive Reaktion eintritt, so kann der betreffende Harn als eiweißfrei im gewöhnlichen Sinne betrachtet werden. Der Harn enthält dann auf jeden Fall weniger als 0,003 % Eiweiß.

»Durch die klassischen Eiweißproben, nämlich die Kochprobe, die Heller'sche Probe und die Boedeker'sche Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe findet man ohne besondere Vorbereitung in der Regel die im Normalharn vorhandenen Eiweißspuren nicht. Insofern ist ein mit diesen Proben eiweißfrei befundener Harn des Gesunden praktisch eiweißfrei. Andrerseits lassen sich mit diesen Proben alle klinisch in Betracht kommenden Albuminurien sicher erkennen und ausreichend beurteilen. Mit besonders empfindlichen Reagentien, z. B. mit dem Spiegler'schen Reagens, der Sulfosalicylsäure und der β-Naphtalinsulfosäure findet man häufig Spuren von Eiweiß im Harne, denen sicher nur eine geringfügige klinische Bedeutung beizumessen ist« (Fr. Kraus). Nach Ansicht dieses bekannten Klinikers lassen sich also alle für den Arzt ernstlich in Betracht kommenden »kleinen Albuminurien« — Albuminuria minima — mit Hilfe der älteren, erprobten, gewissermaßen klassischen Eiweißreaktionen sicher erkennen und auch ausreichend beurteilen.

Farbenreaktionen. In vielen Fällen empfiehlt es sich, die nach den obigen Reaktionen erhaltenen und für Eiweiß angesprochenen Niederschläge abzufiltrieren, mit heißem Wasser auszuwaschen und ihre Eiweißnatur mittels einer Farbenreaktion — Biuret-, Millons- und Adamkiewicz'-Probe — zu bestätigen. Auch das koagulierte Eiweiß gibt die angeführten Eiweißreaktionen.

Getrennter Nachweis von Albumin und Globulin. Man neutralisiert 100—200 ccm Harn genau mit Ammoniak und fügt das gleiche Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung hinzu. Enthält der Harn Globulin, so entsteht sofort ein weißer, flockiger Nieder-

schlag, während das Albumin gelöst bleibt. In einem uratreichen Harne kann sich Ammoniumurat ausscheiden. Das letztere scheidet sich aber nicht sofort ab, sondern kommt erst nach einiger Zeit zum Vorschein und dürfte mit dem Globulinniederschlage kaum verwechselt werden können. — Zum Nachweis des Serumalbumins erhitzt man das Filtrat vom Globulinniederschlage zum Sieden oder versetzt dasselbe mit weiteren Mengen von Ammoniumsulfatlösung. In beiden Fällen wird das Serumalbumin abgeschieden.

Die quantitativen Bestimmungsmethoden des Eiweisses im Harne.

1. **Die gewichtsanalytische Methode oder Koagulationsmethode.** Nach dieser Methode, welche recht zuverlässige Resultate liefert, wird das Eiweiß unter Essigsäurezusatz durch Erhitzen ausgefällt, auf gewogenem Filter gesammelt und bis zum konstanten Gewicht getrocknet. — Man ermittelt erst in kleineren, aber abgemessenen Harnmengen (je 10 ccm) die richtige Menge verdünnte Essigsäure, welche dem vorher im Wasserbade erwärmten Harne zugesetzt werden muß, um das Eiweiß so vollständig auszufällen, daß das Filtrat die Heller'sche Eiweißprobe nicht mehr gibt. — Nach diesem Vorversuche erhitzt man 50 bis 100 ccm des filtrierten Harns in einem Becherglase im siedenden Wasserbade, setzt dann unter Umrühren die nach dem Vorversuche gefundene Menge der verdünnten Essigsäure hinzu und erhitzt noch kurze Zeit, d. h. solange, bis ein leicht abfiltrierbares Koagulum entstanden ist. Dann filtriert man dieses noch heiß durch ein aschefreies, bei 120° getrocknetes und gewogenes Filter, wäscht es nacheinander mit heißem Wasser, Alkohol und Aether aus und trocknet es bei 120° im Luftbade bis zum konstanten Gewicht. Da in das Eiweißkoagulum stets, wenn auch meist recht geringe Mengen Mineralstoffe übergehen, so verascht man das Filter mit dem Eiweißniederschlage in einem gewogenen Platin- oder Porzellantiegel und zieht die hierbei gefundene Asche vom erst erhaltenen Gewicht der Trockensubstanz ab, um die Menge an aschenfreiem Eiweiß zu erfahren, die in dem abgemessenen Harne enthalten ist.

Bemerkungen. Einen sehr eiweißreichen Harn verdünnt man vor der Koagulation des Eiweißes mit der doppelten oder mehrfachen Menge Wasser. Verwendet man bei dieser Bestimmung zuviel Essigsäure, so kann etwas Eiweiß gelöst bleiben. Man überzeuge sich daher mittels der Heller'schen oder der Essigsäure-Ferrocyankalium-Probe, ob die vom Eiweißniederschlage abfiltrierte Flüssigkeit eiweißfrei ist. Sollte dies nicht der Fall sein und mit den genannten Reagentien eine starke Trübung oder gar ein Niederschlag sich bilden, so verwerfe man die Probe und setze eine neue Bestimmung mit weniger Essigsäure an. — H. Thierfelder[1]) erhitzt den filtrierten Harn in einer geräumigen Porzellanschale unter gutem Umrühren über einer kleinen Flamme zum Kochen, fügt, falls keine gute, flockige Gerinnung erfolgt, vorsichtig einige Tropfen sehr verdünnter Essigsäure hinzu, erhitzt wiederum zum Sieden und prüft abermals, ob die über dem Koagulum stehende Flüssigkeit klar erscheint. Ist dies der Fall, so filtriert man noch kochend heiß durch ein gewogenes Filter und verfährt wie oben.

[1]) Handbuch, VIII. Aufl. 1909.

2. Die Bestimmung mit Hülfe des Esbach'schen Albuminimeters.

Erfordernisse. 1. Albuminimeter nach Esbach. 2. Esbach'sche Lösung, die in 100 ccm Wasser 1 g Pikrinsäure und 2 g Citronensäure enthält.

Ausführung. Man füllt das Albuminimeter (Fig. 19) bis zur Marke U mit dem sauer reagierenden, oder bei ursprünglich neutraler oder alkalischer Reaktion, mit dem, mit Essigsäure angesäuerten Harn, fügt Esbach'sches Reagens bis zur Marke R hinzu, verschließet mit dem zum Apparat gehörenden Gummistopfen und kehrt das Albuminimeter einige male vorsichtig um, so daß Schaumbildung nicht eintritt. Man läßt nun das Rohr bei 15° 24 Stunden ruhig stehen und liest dann an der Skala des Rohrs den Teilstrich ab, bis zu welchem der entstandene Eiweißniederschlag sich erstreckt. Die an diesem Teilstriche stehende Zahl gibt die Eiweißmenge in Grammen an, die in 1000 ccm, also in 1 Liter, Harn enthalten ist. — Ist der Harn bei der Vorprobe sehr eiweißreich befunden worden, so verdünnt man ihn vor dem Anstellen der Esbach'schen Probe mit der gleichen oder doppelten Menge Wasser, was natürlich in Rechnung zu bringen ist. — Man führe die Bestimmungen stets bei der gleichen Temperatur von 15° aus, weil sonst nicht unerhebliche Fehler im Resultate entstehen können. — Die Esbach'sche Methode wird für klinische Zwecke vielfach benutzt.

Fig. 19.



3. Die Bestimmung nach Tsuschija.

Erfordernisse. 1. Albuminimeter nach Tsuschija[1]. 2. Phosphorwolframsäurereagens: 1 g frische, gut kristallisierte Phosphorwolframsäure + 5 g konzentrierte Salzsäure + 100 g Alkohol von 90 %.

Ausführung. Man füllt das Albuminimeter bis zur Marke U mit dem filtrierten Harn, dessen spez. Gew. 1,006 bis 1,008 betragen soll, (ein konzentrierterer Harn ist vorher entsprechend zu verdünnen), dann bis zur Marke R mit dem Phosphorwolframsäurereagens, kehrt das Albuminimeter vorsichtig 10 bis 15 mal um und läßt es dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur ruhig stehen. Nun liest man am Albuminimeter den Teilstrich ab, bis zu welchem der entstandene Niederschlag reicht; die neben dem Teilstriche stehende Zahl gibt in Grammen die Menge Eiweiß von 1000 ccm Harn an. — Wie bei der Esbach'schen Methode ist auch bei dieser der Harn mit der gleichen oder mehrfachen Menge Wasser zu verdünnen, falls er mehr als 6 ‰ Eiweiß enthalten sollte. Ebenso müssen alle Bestimmungen bei der gleichen Temperatur (15°) ausgeführt werden.

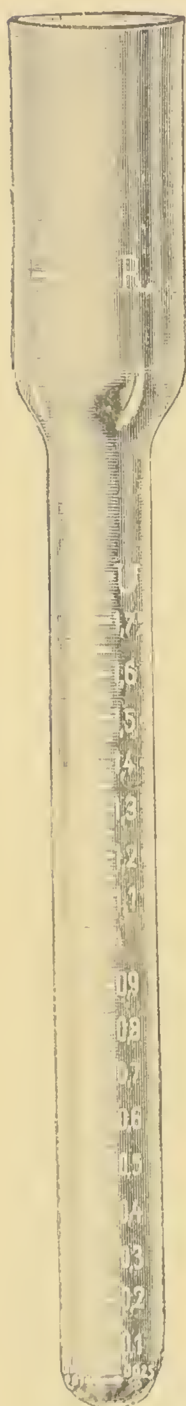
---

[1]) Dieses Albuminimeter kann von Rudolph Schoeps in Halle a./S. bezogen werden.

4. Die Bestimmung von Eiweiss im Harn mit Dr. Aufrecht's Albuminimeter.

Erfordernisse: 1. Das Albuminimeter nach Dr. Aufrecht — 2. Reagens: Man löse 1,2 g Pikrinsäure und 3 g Citronensäure in Wasser auf 100 ccm. — 3. Zentrifuge; es genügt eine Handzentrifuge mit 2000 bis 2500 Umdrehungen in der Minute.

Fig. 20.



Ausführung. Man füllt das Albuminimeter (Fig. 20) bis zur Marke U mit dem sauren, eventuell vorher mit Essigsäure angesäuerten Harn, schichtet bis zur Marke R das Reagens darüber, verschließt mit dem beigegebenen Gummistopfen und mischt die beiden Flüssigkeiten durch mehrmaliges langsames Umwenden des Albuminimeters. Letzteres wird in eine beliebige Zentrifuge gebracht und je nach der Tourenzahl der Zentrifuge verschieden lang zentrifugiert. Bei Zentrifugen mit etwa 2000 bis 2500 Umdrehungen in der Minute zentrifugiere man drei Minuten, bei solchen mit 3000 Umdrehungen genügen schon $2^1/_2$ Minuten. Die Zahl am Albuminimeter, die sich in gleicher Höhe mit dem entstandenen Eiweißniederschlage befindet, gibt die Eiweißmenge des untersuchten Harns in Prozenten an.

Bemerkungen. Die Bestimmungen von Eiweiß im Harn mit Hilfe des Albuminimeters nach Dr. Aufrecht stimmen mit den nach der Esbach'schen wie auch nach der gewichtsanalytischen Methode ermittelten Eiweißwerten gut überein, wie folgende vergleichende Untersuchung ergeben hat:

Der Eiweißgehalt eines Harns wurde nach Esbach zu 0,20% — nach 24 Stunden abgelesen —, nach Aufrecht zu 0,23% und gewichtsanalytisch zu 0,24% ermittelt. Ein großer Vorzug der Aufrecht'schen Methode vor der Esbach'schen oder der gewichtsanalytischen Methode ist der, daß sich der Eiweißgehalt eines Harns in 3 bis 5 Minuten ermitteln läßt, dabei ist das Ablesen der Eiweißmenge recht scharf. Ein Verdünnen des Harns ist selbst bei einem abnorm hohen Eiweißgehalt nicht erforderlich. Die Menge an Niederschlag, die man im Albuminimeter erhält, ist weder von der Dichte noch von der Temperatur des Harns abhängig, wie dies bei der Esbach'schen Methode der Fall ist. Mit Zunahme der Temperatur wird die Viskosität des Harns vermindert, was ein Zusammenballen des Niederschlags zur Folge hat, während eine erhöhte Dichte des Harns umgekehrt wirkt, weil dann die Viskosität vermehrt ist. Alle diese Uebelstände kommen in Wegfall, wenn man den Niederschlag unter Zentrifugieren herstellt.

Mucin (Mukoid), wahres Nukleoalbumin und sogenanntes Nukleoalbumin.

Die Mucine gehören zu den Glukoproteiden, das sind Ver-

bindungen der Eiweißstoffe mit einem Kohlehydrat oder einem Kohlehydratderivat.

Echte Mucine sind charakterisiert durch die fadenziehende Beschaffenheit ihrer natürlichen oder der mit wenig Alkalilauge bereiteten Lösungen. Die Mucine sind ausgesprochene Säuren, die aus ihren alkalischen Lösungen durch stärkere Säuren gefällt werden. Wie alle Glukoproteide reduzieren auch die Mucine nach dem Kochen mit Salzsäure und darauffolgendem Alkalisieren mit Natron- oder Kalilauge beim Erwärmen die Fehling'sche Lösung. Charakteristisch für Mucine ist ihre Fällbarkeit durch Essigsäure und die Unlöslichkeit des hierdurch gebildeten Niederschlags im Ueberschusse der Essigsäure. — Nach Fr. Kraus[1]) kommt echtes Mucin besonders im Harn der Frauen häufig vor; es entstammt der Schleimhaut der Harnwege. Das Vorhandensein von Mucin gehört mit zu den Ursachen der Entstehung einer »nubecula« im Harn. Bei verschiedenen Krankheiten kann dasselbe eine Vermehrung erfahren (bei Cystitis, Tripper und sonstigen Affektionen der Urethra), ferner bei gewissen Intoxikationen: Kanthariden, Terpentinöl usw. (Fr. Kraus).

Nukleoalbumine sind ebenfalls gepaarte Proteine, nämlich Verbindungen von Eiweiß mit einem phosphorhaltigen Atomkomplex, die aber im Unterschiede zu den Nukleoproteiden bei ihrer hydrolytischen Spaltung keine Pyrimidin- und Purinbasen (Nukleinbasen) liefern. Die Nukleoalbumine sind ausgesprochene Säuren und werden aus ihren Lösungen durch stärkere Säuren gefällt; sie sind in Wasser nahezu unlöslich, aber darin leicht löslich, wenn wenig Alkalilauge zugesetzt wird. Derartig hergestellte Lösungen der echten Nukleoalbumine koagulieren beim Erwärmen nicht.

Sogenanntes Nukleoalbumin ist eine Eiweiß-Chondroitinschwefelsäureverbindung.

Nachweis von echtem Mucin, sogenanntem Nukleoalbumin (Eiweiss-Chondroitinschwefelsäureverbindung), und wahrem Nukleoalbumin im Harn.

Man versetzt eine größere Menge (Tagesmenge) Harn kalt mit verdünnter Essigsäure, läßt einige Zeit stehen, filtriert einen gebildeten Niederschlag ab, wäscht ihn zur Entfernung von etwa vorhandenem Traubenzucker mit warmem Alkohol wiederholt aus und löst ihn auf dem Filter in wenig alkalihaltigem Wasser. Die so erhaltene Lösung wird mit im Ueberschusse zugesetzter 5%iger Salzsäure einige Minuten gekocht oder längere Zeit auf dem Wasserbade erwärmt, um die das Mucin zusammensetzende Verbindung des Eiweißes mit der Kohlehydratgruppe aufzuspalten. Diese salzsaure Lösung wird dann in zwei Teile geteilt; der eine Teil wird zur Prüfung auf die Kohlehydratgruppe erst mit Natron- oder Kalilauge alkalisch gemacht, dann mit Fehling'scher Lösung erwärmt. Da aber auch die häufig im menschlichen

[1]) Veröffentlichungen aus dem Gebiete des Militär-Sanitätswesens Heft 48, S. Berlin 1911. (Referat von Prof. Dr. Fr. Kraus).

Harne vorkommende Verbindung von Eiweiß mit Chondroitinschwefelsäure (vergl. diese) = »sogenanntes Nukleoalbumin« des Harns, nach dem Kochen mit Salzsäure die Fehling'sche Lösung ebenfalls reduziert, so beweist die Ausscheidung des Kupferoxyduls noch nicht das Vorhandensein von echtem Mucin in dem mit Essigsäure aus dem Harne erhaltenen Niederschlage. Es muß deshalb der zweite Teil der erhaltenen salzsauren Lösung mit Baryumchlorid auf einen Gehalt an Schwefelsäure geprüft werden. Tritt hierbei keine Fällung von Baryumsulfat ein, so ist echtes Mucin nachgewiesen. Erfolgt aber eine Fällung von Baryumsulfat, so hat eine Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit Plasmaeiweiß, welche durch Kochen mit Salzsäure gleichfalls gespalten wird, vorgelegen. In einem solchen Falle kann selbstverständlich neben der Eiweiß-Chondroitinschwefelsäureverbindung auch echtes Mucin vorhanden sein.

Wahres Nukleoalbumin. Es ist ganz sicher erwiesen, daß im normalen Harn, wenn auch gewöhnlich in sehr geringen Mengen, Albumin und Globulin vorkommen können. Nach Untersuchungen von Mörner sind im normalen Harn neben Eiweiß gewöhnlich auch eiweißfällende Substanzen vorhanden, nämlich Chondroitinschwefelsäure, Nukleinsäure und in einzelnen Fällen, besonders bei Ikterus, Taurocholsäure. Durch Zusatz von Essigsäure zum Urin werden diese Säuren aus ihren Alkalisalzen freigemacht und gehen mit den stets vorhandenen Eiweißspuren unlösliche Verbindungen ein. Dieser Niederschlag kann dann Nukleoalbumin vortäuschen. (S. oben). — Der Nachweis von wahrem Nukleoalbumin geschieht nach Fr. Kraus (l. c.) in der folgenden Weise: Der im verdünnten Harne mit Essigsäure hervorgerufene Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, mit Wasser und warmem Alkohol gewaschen und in verdünnter Alkalilauge gelöst; in diese Lösung wird bei 30⁰ Magnesiumsulfat eingetragen und der enstandene Niederschlag wiederum in Wasser gelöst. Darauf wird abermals mit Essigsäure gefällt, um vorhandene Beimengungen von Calciumphosphat zu entfernen; den nochmals mit heißem Alkohol ausgewaschenen Niederschlag schmilzt man schließlich mit Soda und Salpeter zusammen. Die mit verdünnter Salpetersäure angesäuerte Lösung der Schmelze wird schließlich mit Molybdatreagens auf Phosphorsäure geprüft. Gelingt der Nachweis der Phosphorsäure in dieser Schmelze, so spricht dieser für das Vorhandensein von Nukleoalbumin im Harne.

Bemerkungen. Nach Fr. Kraus (l. c.) ist reichlicheres Auftreten von wahrem Nukleoalbumin beobachtet bei Pneumonie, bei Katarrhen der Harnwege, bei Nephritis und zwar hier neben gewöhnlichem Eiweiß, bei nicht febriler Tuberkulose, bei Leukämie (?).

Nukleohiston. Histone sind ziemlich stark basische Eiweißstoffe, die eine Zwischenstellung einnehmen zwischen den eigentlichen Eiweißstoffen und den stärker basischen Protaminen. Die Histone geben die Biuretreaktion regelmäßig, aber die Millon'sche Reaktion meist nur schwach. Die verschiedenen Histone zeigen die folgenden Reaktionen: Die neutralen salzfreien Lösungen gerinnen beim Sieden. Ueberschüssiges Ammoniak fällt die Lösungen aus; ebenso Alkalilauge und

die alkalischen Erden; im Ueberschusse der Alkalilaugen sind die Niederschläge wieder löslich. Salpetersäure fällt die Histonlösungen aus, und zwar verschwindet der Niederschlag beim Erwärmen, um beim Erkalten wieder zum Vorschein zu kommen. Die Histone finden sich im Tierkörper in Verbindung mit Nukleinsäure: Nukleohistone. Essigsäure fällt Nukleohiston aus seinen neutralen Lösungen. Der Niederschlag unterscheidet sich von demjenigen der Nukleoalbumine dadurch, daß er nach dem Lösen in verdünnter Natriumcarbonatlösung durch Zusatz von Magnesiumsulfat bis zur Sättigung nicht mehr ausgefällt wird.

Wenn also ein filtrierter, absolut klarer Urin, der zweckmäßigerweise erst mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt wird, mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt beim Stehen eine Trübung oder Fällung gibt, so kann es sich um verschiedene Stoffe handeln, nämlich um wirkliches Mucin, wahres Nukleoalbumin, sogenanntes Nukleoalbumin = Eiweiß-Chondroitinschwefelsäureverbindung, und um Nukleohiston.

Ueber den sicheren Nachweis der Albumosen im Harn[1].

Blut und Blutfarbstoff.

Im Blutharn können intakte Blutkörperchen vorhanden sein oder der Harn enthält nur gelösten Blutfarbstoff, Oxyhaemoglobin, Haemoglobin oder Methaemoglobin. (Haemoglobinurie.)

Falls Blutungen in den Nieren oder sonstwo in den Harnwegen vorkommen, kann der Harn bluthaltig werden (Haematurie). Bei frischen Blutungen, bei welchen sich der Blutfarbstoff noch nicht zersetzt hat, ist die Farbe des Harns blutrot. In anderen Fällen ist der Harn rötlich, gelbrot, braunrot oder sogar braunschwarz gefärbt und mehr oder weniger stark getrübt. Im Sedimente, das sich im Harn bildet, findet man häufig Blutkörperchen, größere oder kleinere Blutgerinnsel, manchmal auch Blutzylinder. — Blutfarbstoff kommt als solcher oder bereits in Methaemoglobin verwandelt im gelösten Zustande im Harne bei Vergiftungen mit chlorsaurem Kalium, Nitrobenzol, Anilin, Arsenwasserstoff u. a. vor, ferner nach schweren Verbrennungen.

Der Nachweis von Blut und Blutfarbstoff im Harne kann auf verschiedene Weise geführt werden.

1. Die Mikroskopische Untersuchung. Die Blutkörperchen können sich im sauer reagierenden Harne verhältnismäßig lange unverändert halten, im alkalischen Harne werden sie dagegen leicht gelöst oder wenigstens verändert. Im Harnsedimente sind die Blutkörperchen oftmals fast unverändert, oder sie sind aufgequollen oder von unregelmäßiger, gezackter, stechapfelähnlicher Form. Bei Nierenblutungen kommen auch sog. Blutzylinder im Sedimente vor, das sind zylinderförmige Gerinnsel, welche mit Blutkörperchen besetzt sind und Abgüsse der Harnkanälchen darstellen.

2. Die Guajakprobe beruht darauf, daß Blut oder Blutfarbstoff auf altes Terpentinöl als Katalysator einwirkt, indem es die Zersetzung der in dem Terpentinöle enthaltenen organischen Peroxyde beschleunigt und den freigewordenen aktiven Sauerstoff auf die Guajakon-

[1]) Vgl. den Nachtrag von Seite 338.

säure der Guajaktinktur überträgt, welche hierdurch in Guajakonsäureozonid, auch Guajakblau genannt, übergeführt wird.

Man mischt in einem Probierrohre gleiche Raumteile weingeistiger Guajakharztinktur, die in einer Flasche aus dunkeln Glase aufzubewahren ist, und älteres Terpentinöl und fügt zu diesem Gemische, das keine blaue Führung zeigen darf, den zu untersuchenden Harn. Enthält der Harn Blut oder nur Blutfarbstoff, so bildet sich an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten erst eine blaugrüne, dann eine reine blaue Schicht. Schüttelt man um, so färbt sich die Mischung mehr oder weniger schön blau. Normaler und auch stark eiweißhaltiger Harn gibt diese Probe nicht. Andererseits kann Eiter, der in einem Harne zugegen ist, Blut vortäuschen, indem derselbe Terpentinöl-Guajakgemisch ebenfalls blau färbt. Durch eiterhaltigen Harn wird freilich die Guajaktinktur allein, also ohne Terpentinöl, schon blau gefärbt. Erhitzt man einen derartigen eiterhaltigen Harn zum Sieden, so geht die bläuende Wirkung des Eiters verloren, nicht aber diejenige des Blutfarbstoffs.

Einen alkalisch reagierenden Harn muß man vor dem Anstellen der Probe mit Essigsäure schwach ansäuren. — Das zu verwendende Terpentinöl muß längere Zeit in einer schlecht schließenden Flasche im Sonnenlichte gestanden haben, um Ozonhaltig zu werden, wie man früher angenommen hat; in der Tat entstehen hierin organische Peroxyde. Es empfiehlt sich, die zu verwendenden Reagenzien, also das Terpentinöl und die Guajaktinktur, mit einer Spur einer bluthaltigen Flüssigkeit auf ihre Empfindlichkeit zu prüfen. — Die Guajakprobe ist außerordentlich empfindlich; fällt sie negativ aus, so ist eine weitere Untersuchung auf Blut und Blutfarbstoff überflüssig. Anders verhält es sich mit einem positiven Ausfall der Probe; da auch andere, zumal anorganische Stoffe wie salpetrige Säure, das Guajakharz-Terpentinölgemisch blau färben, so ist eine weitere Bestätigung des Befundes durch andere Blutproben unbedingt erforderlich.

Bemerkungen. O. Schumm[1]) hat die Guajakblutprobe näher studiert; von ihm liegen nähere Angaben vor über die Bereitung der Reagentien und die Ausführung der Reaktion. Die für die Probe erforderliche Guajaktinktur ist frisch herzustellen, indem man eine Messerspitze voll des Guajakharzpulvers (etwa 0,5 g) mit 3—5 ccm 90%igen Alkohols 1 Minute schüttelt, dann etwa 10 Tropfen davon abfiltriert. Die Menge von 10 Tropfen Tinktur bewährt sich durchschnittlich am besten. Handelt es sich um den Nachweis kleinster Blutmengen, so nimmt man nur 3—5 Tropfen Tinktur, da gerade in einem solchen Falle ein größerer Ueberschuß von Guajaktinktur die Reaktion stört. Z. B. wird nach Schumm die höchste Empfindlichkeit dann erreicht, wenn man 5 ccm Harn mit 5 Tropfen Guajaktinktur und 20 Tropfen Terpentinöl versetzt und unter öfterem Umschütteln einige Minuten stehen läßt. Gießt man einige Kubikzentimeter Alkohol auf die Terpentinölschicht, so wird die Färbung noch deutlicher. — Ein sehr wirksames Terpentinöl erhielt Schumm in der Weise, daß er das käufliche Oel in flachen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 374 (1906/7).

Porzellanschalen oder Kristallisierschalen längere Zeit im zerstreuten Tageslicht stehen ließ; hierbei wird es dickflüssig und verliert fast seinen Geruch. Obgleich dieses dicke Oel eine sehr kräftige Wirkung hat, eignet es sich nicht direkt als Reagens, wohl aber nach dem Verdünnen mit der fünffachen Menge gewöhnlichen Terpentinöls —. Von Stoffen, welche die Guajakprobe ebenfalls geben, kommen die oxydierend wirkenden Fermente in Betracht; diese in den Geweben und Säften des tierischen und pflanzlichen Organismus weit verbreiteten Stoffe können durch Aufkochen der zu untersuchenden Flüssigkeit vorher unschädlich gemacht werden; ebenso verfährt man, wenn eiterhaltiger Urin (s. oben), Speichel, Schleim, Magensaft auf Blut zu untersuchen sind. Von anorganischen Stoffen, welche ebenfalls die Reaktion geben, kommen neben salpetriger Säure Jodkalium und Ferrisalze in Betracht. Diese Stoffe bläuen die Guajaktinktur direkt, ohne Zusatz von Terpentinöl. Um sich gegen derartige Stoffe zu schützen, muß man nach Weber im Zweifelsfalle das Untersuchungsmaterial mit Essigsäure und Aether ausziehen, die saure Aetherlösung noch zweimal mit wenig Wasser ausschütteln, dann mit der abfiltrierten Aetherlösung die Guajakblutprobe anstellen.

3) Die Heller-Teichmann'sche Probe. Beim Erwärmen einer wässerigen Oxyhämoglobin- oder Hämoglobinlösung zersetzt sich der Blutfarbstoff von etwa 70° ab in koaguliertes Eiweiß und Hämatin, die sich Beide als wasserunlöslich abscheiden. Erhitzt man daher einen bluthaltigen, neutral oder schwach sauer reagierenden Harn zum Sieden, so erhält man einen aus Eiweiß und Hämatin bestehenden mißfarbigen Niederschlag. Versetzt man die siedend heiße Probe mit Natronlauge, so klärt sich die Flüssigkeit, nimmt durch gebildetes Hämatinalkali in dünner Schicht eine grüne Färbung an und bildet allmählich einen flockigen, roten, aus Erdphosphaten und Hämatin bestehenden Niederschlag (Heller'sche Blutprobe). Man kann diesen Niederschlag auf einem Filterchen sammeln, mit heißem Wasser auswaschen und zur Häminprobe verwenden. Zu dem Zweck bringt man den Niederschlag auf ein flaches Uhrschälchen oder einen Objektträger, fügt eine Spur Kochsalz hinzu, trocknet auf dem Wasserbade ein, zerreibt den Rückstand mit einigen Tropfen Eisessig, legt dann ein Deckgläschen auf den Objektträger und trocknet über kleiner Flamme oder auf dem Wasserbade ein. Sollten nach dem ersten Erwärmen keine Häminkristalle, die auch Teichmann'sche Kristalle genannt werden, sichtbar werden, so erwärmt man noch ein zweites und drittes Mal mit neuen Mengen Eisessig. Nach dem Erkalten und vollständigen Eintrocknen werden, falls der untersuchte Niederschlag hämatinhaltig war, braune und schwarzbraune Häminkristalle sichtbar. Besonders am Rande des Deckgläschens finden sich häufig schön ausgebildete, größere Häminkristalle. Gelingt es, aus einem Harne bezw. aus dem nach dem Kochen mit Natronlauge erhaltenen Niederschlage Häminkristalle herzustellen, so enthält der Harn bestimmt Blutfarbstoff, da diese Kristalle für das Vorhandensein von Blut außerordentlich beweisend sind.

Bemerkungen. Sollte der mit Natronlauge entstehende Niederschlag

viel Erdphosphat aber nur wenig Hämatrin erhalten, so entfernt man das erstere durch Auswaschen mit verdünnter Essigsäure und verwendet den ungelöst bleibenden Teil für die Darstellung der Teichmannschen Häminkristalle. — Ist umgekehrt die Menge der Phosphate sehr klein, so versetzt man den Harn erst mit wenig Magnesiumchloridlösung, erhitzt zum Sieden und fügt gleichzeitig Natronlauge und wenig Natriumphosphatlösung hinzu.

4) Die spektroskopische Untersuchung leistet vorzügliche Dienste für die Erkennung des Blutfarbstoffs im Harne. Doch müssen mehr als Spuren des Farbstoffs vorhanden sein. Hat man die beiden für das Oxyhämoglobin charakteristischen Streifen im Spektrum erhalten, so fügt man wenig Schwefelammonium hinzu, um das breite diffuse Band des Hämoglobinspektrums zu erhalten. — Enthält der Harn Methämoglobin, wie dies bei gewissen Vergiftungen der Fall sein kann (s. oben), so wird das für diesen Blutfarbstoff charakteristische Absorptionsspektrum sichtbar.

5) Die Benzidinprobe von O. und R. Adler[1]. Man verwendet eine in der Hitze hergestellte konzentrierte und nach dem Abkühlen filtrierte alkoholische Benzidinlösung[2]. Man prüfe zunächst die Empfindlichkeit der Probe mit einer sehr stark verdünnten wässerigen Blutlösung. Man versetzt diese wässerige Lösung mit etwas Wasserstoffsuperoxyd (3%iges), mit einigen Tropfen Essigsäure und schließlich mit einigen ccm der Benzidinlösung. Die Gegenwart des Blutes gibt sich an einer auftretenden prachtvollen Grünfärbung zu erkennen.

Die Benzidinprobe zeichnet sich durch große Empfindlichkeit aus, indem sie selbst bei einer Verdünnung des Blutes von 1 : 100000 noch deutlich eintritt, während mittelst der Guajakprobe Blut nur noch in einer Verdünnung von 1 : 25000 nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis von Blut im Harn arbeitet man nach Art der Weber'schen Modifikation der Guajakblutprobe (s. oben):

Man versetzt 15 ccm Harn mit dem halben Volumen Eisessig, wodurch vorhandenes Hämoglobin in Hämatin umgewandelt wird. Hierauf wird mit Aether ausgeschüttelt, der das Hämatin aufnimmt. Eine etwa auftretende Emulsion kann durch Zusatz einiger Tropfen Alkohol entfernt werden. Man trennt die Aetherschicht in einem Scheidetrichter, versetzt sie mit der alkoholischen Benzidinlösung, etwas Wasserstoffsuperoxyd und einigen Tropfen Essigsäure. Ist der Harn bluthaltig gewesen, so färbt sich das Gemisch intensiv grün. — Auch nach dem Kochen gibt bluthaltiger Harn noch die Benzidinprobe.

Oxydierende Fermente sowohl tierischer wie pflanzlicher Herkunft geben ausgesprochen positive Benzidinreaktion. Speichel, Eiter, das Sekret der Nasenschleimheit, Darmdetritus und Darmschleim, in dem sich mikroskopisch nur

[1]) O. Adler und R. Adler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 59 (1904).

[2]) Benzidin = Di-para-Diamidodiphenyl, $H_2N \cdot C_6H_4 — C_6H_4 \cdot NH_2$, kristallisiert aus Wasser in großen, glänzenden Blättern vom Schmp. 127,5—128°, ist in heißem Wasser ziemlich schwer, in Aether leichter löslich. Benzidin ist durch verschiedene empfindliche Farbenreaktionen ausgezeichnet.

Leukocyten nachweisen ließen, gaben mehr oder weniger starke Proben (O. Schumm und C. Westphal)[1]).

6) Die Paraphenylendiaminchlorhydratprobe[2]) ist speziell für den Nachweis von Blutfarbstoff in den Faeces und im Magensaft empfohlen worden, kann aber auch für den Harn Verwendung finden. Man verwendet eine wässerige para-Phenylendiaminchlorhydratlösung[3]) 0,5 : 100. Man wendet die Reagentien in folgender Reihenfolge und Menge an: 2 Tropfen der Diaminchlorhydratlösung, $^1/_2$ ccm etwa $^1/_2$ n-alkoholischer Kalilauge, 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd (3%) und dann tropfenweise 3%ige Essigsäure. Ein charakteristischer Farbenumschlag in Olivgrün tritt beim Essigsäurezusatz ein, und allmählich entsteht eine Rot-, Braunrot- oder Violettfärbung, wenn Blut vorhanden ist.

Hämatoporphyrin.

Hämatoporphyrin, $C_{16}H_{18}N_2O_3$ oder $C_{34}H_{38}N_4O_6$, ist wiederholt bei schwerer Sulfonalintoxikation im Harn nachgewiesen worden. Es findet sich ferner im Magen- und Darminhalt vor, wenn konzentrierte Schwefelsäure in den Magen gelangt. Bei Darmblutungen, Bleikolik und gewissen Erkrankungen der Leber kann es im Harne vorkommen. Nach Ansicht von Garrod soll jeder normale Menschenharn Spuren von Hämatoporphyrin enthalten.

Hämatoporphyrin, ein eisenfreier Farbstoff, entsteht immer dann, wenn starke Säuren auf Hämatin, Hämin oder Hämochromogen einwirken. M. Nencki und J. Zaleski[4]) geben für die Darstellung des Hämatoporphyrins die folgende Vorschrift: Je 5 g Hämin werden in 75 ccm bei 10° mit Bromwasserstoffgas gesättigtem Eisessig in kleinen Mengen und unter häufigem Umschütteln eingetragen. Man läßt nun dieses Gemisch 3—4 Tage bei Zimmertemperatur stehen und schüttelt öfters um; wenn alles Hämin gelöst ist und die Lösung die schön rote Farbe der Hämatoporphyrinlösungen angenommen hat, gießt man den Kolbeninhalt in destilliertes Wasser und filtriert den meist nur geringen Bodensatz nach mehrstündigem Stehen ab. Im Filtrat neutralisiert man den Bromwasserstoff, nicht aber die Essigsäure, mit verdünnter Natronlauge, wobei das in verdünnter Essigsäure unlösliche Hämatoporphyrin fast vollständig ausfällt. Der durch Dekantation so lange ausgewaschene Niederschlag, bis das Waschwasser durch Silbernitrat nicht mehr getrübt wird, wird durch Liegenlassen zwischen Filtrierpapier vom größten Teil des anhaftenden Wassers befreit, dann noch feucht mit

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 510 (1905).

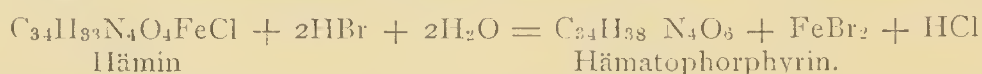
[2]) J. Boas, Ein neues Reagens für den Nachweis okkulter Blutanwesenheit im Mageninhalt und in den Faeces, Zentralblatt für innere Medizin 1906, Nr. 24.

[3]) Para-Phenylendiaminchlorhydrat, von der Zusammensetzung $C_6H_4(NH_2HCl)_2$, 1,4, kristallisiert in triklinen Tafeln, ist leicht löslich in Wasser, weniger in Alkohol und fast unlöslich in Salzsäure.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 423 (1900).

reiner verdünnter Natronlauge auf dem Wasserbade $^1/_4$ Stunde lang gelinde erwärmt und abfiltriert. Aus dem alkalischen Filtrate wird der Farbstoff durch Essigsäure wieder gefällt, nach dem Auswaschen in einer Schale mit wenig Wasser zu einem dicken Brei angerührt und unter Umrühren mit Salzsäure so lange versetzt, bis der Farbstoff gerade in Lösung gegangen ist. Das gebildete salzsaure Hämatoporphyrin ist in Wasser leicht löslich, mit zunehmendem Gehalt an Salzsäure nimmt aber seine Löslichkeit bedeutend ab; es ist daher zu empfehlen, die Lösung von dem ausgeschiedenen Harz abzufiltrieren und das Filtrat noch mit Salzsäure zu versetzen. Sollte jetzt nochmals ein harziger Niederschlag entstehen, so filtriert man rasch ab und stellt das Filtrat in das Vacuum über Schwefelsäure. Schon nach einigen Stunden erstarrt das Filtrat in der Regel zu einem Kristallbrei. Man läßt aber zweckmäßig noch 2—3 Tage im Vacuum stehen, saugt dann die ausgeschiedenen Kristalle ab und wäscht sie mit 10%iger Salzsäure nach.

Die Entstehung des Hämatoporphyrins aus dem Hämin durch Einwirkung von Bromwasserstoffsäure entspricht der folgenden Gleichung:



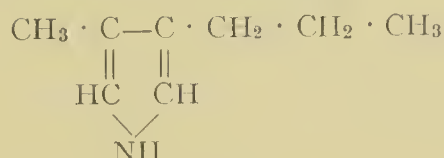
$$\underset{\text{Hämin}}{C_{34}H_{33}N_4O_4FeCl} + 2HBr + 2H_2O = \underset{\text{Hämatophorphyrin.}}{C_{34}H_{38}N_4O_6} + FeBr_2 + HCl$$

Salzsaures Hämatoporphyrin, $C_{34}H_{38}N_4O_6 \cdot 2HCl$, bildet braunrote Kristallnadeln, ist in Alkohol, namentlich 60—70% igem, bedeutend leichter löslich als in Wasser, doch eignet sich Alkohol zum Umkristallisieren des Salzes nicht. Freies Hämatoporphyrin erhält man aus den Lösungen des salzsauren Salzes mittels Natriumacetat als einen flockigen, braunroten, in Wasser und verdünnter Essigsäure unlöslichen Niederschlag; es ist löslich in Alkalilaugen, in Lösungen der Alkalikarbonate, in verdünnten Mineralsäuren sowie in Alkohol. In alkoholischem Ammoniak gelöstes Hämatoporphyrin bildet beim Stehen im Vacuum ein in roten Nadeln kristallisierendes, sehr unbeständiges Ammoniumsalz. Hämatoporphyrin verhält sich wie eine Amidosäure, indem es mit Säuren und Basen Verbindungen eingeht. Es enthält zwei Hydroxylgruppen, da sich durch Erhitzen des reinen Hämatoporphyrins mit absolutem Methylalkohol und konzentrierte Schwefelsäure ein Dimethyläther, das Dimethylhämatoporphyrin, darstellen läßt. — Beim Erhitzen des trockenen Hämatoporphyrins tritt Pyrrolgeruch auf. Durch Oxydation mit Natriumbichromat und Eisessig entsteht Hämatinsäure und durch Reduktion mit Zinn und Salzsäure ein dem Urobilin ähnlicher Farbstoff.

Durch Erwärmen von salzsaurem Hämatoporphyrin mit Jodwasserstoffsäure und Jodphosphonium, also durch einen Reduktionsprozeß, entsteht ein neuer, wohlcharakterisierter Farbstoff, das Mesoporphyrin, $C_{34}H_{38}N_4O_4$ (Zaleski)[1]), das auch aus Hämin direkt nach dem gleichen Verfahren erhalten wird. Bei der Einwirkung von jodwasserstoffhaltigem Eisessig und Jodphosphonium auf Hämin unter ganz

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 54 (1902/3).

bestimmten Bedingungen entsteht als einziges Reduktionsprodukt Hämopyrrol, $C_8H_{13}N$[1]), ein flüchtiges Oel, das einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan intensiv rot färbt. Unter denselben Bedingungen entsteht das gleiche Hämopyrrol aus dem Phyllocyanin, einem nahen Derivat des Chlorophylls. Wahrscheinlich ist Hämopyrrol ein Methylpropylpyrrol von der Zusammensetzung



oder aber ein Methyläthylpyrrol.

Küster hält das Hämopyrrol auf Grund seiner neueren Versuchsergebnisse für ein Gemisch von zwei Pyrrolderivaten, nämlich von zwei Methyläthylpyrrolen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß Hämatoporphyrin dem Bilirubin isomer ist.

Nachweis des Hämatoporphyrins im Harn.

Wie bereits bemerkt wurde, findet sich Hämatoporphyrin besonders reichlich im Harne vor nach andauerndem Gebrauche des Schlafmittels Sulfonal. Ein solch' hämatoporphyrinhaltiger »Sulfonalharn« ist mehr oder weniger dunkelrot gefärbt. Erkannt wird das Hämatoporphyrin durch spektroskopische Untersuchung.

1. Nach Salkowski. Man fällt 50—100 ccm Harn mit einer alkalischen Chlorbaryumlösung (= Mischung aus gleichen Vol. kaltgesättigter Aetzbaryt- und 10%iger Chlorbaryumlösung) vollständig aus, filtriert ab, wäscht den Niederschlag, der etwa vorhandenes Hämatoporphyrin enthält, mit kaltem Wasser gut aus, läßt ihn dann mit salzsäure- oder schwefelsäurehaltigem Alkohol bei Zimmertemperatur ca. 15 Minuten lang stehen und filtriert wiederum ab. Das Filtrat zeigt bei Vorhandensein von Hämatoporphyrin das charakteristische Spektrum des Hämatoporphyrins in saurer Lösung, nämlich zwei Absorptionsstreifen, von denen der eine, nämlich der schwächere und weniger breite, zwischen C und D, nahe an D gelegen ist, und der andere dunklere, breitere und schärfere Streifen ungefähr in der Mitte zwischen D und E liegt. — Uebersättigt man die saure alkoholische Lösung mit Ammoniak, so wird das Spektrum der alkalischen Hämatoporphyrinlösung sichtbar, nämlich vier Absorptionsstreifen: einen Streifen findet man zwischen C und D, einen zweiten breiteren um D herum, einen dritten zwischen D und E, in der Nähe von E, und einen vierten Streifen, der ziemlich breit und dunkel erscheint, zwischen E und F. Die Lage der Hämatoporphyrinstreifen im Spektrum wechselt und scheint abhängig zu sein von der Darstellungsweise und der Art des Lösungsmittels, so daß sie also nicht immer denselben Wellenlängen entsprechen.

---

[1]) M. Nencki und J. Zaleski, Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 34, 997 (1901).

O. Hammarsten fällt den Harn mit Baryumacetatlösung aus.

2. Nach Garrod. Man fällt den Harn mit 10%iger Natronlauge aus, von der man je 20 ccm auf 100 ccm Harn nehme, filtriert den phosphathaltigen Niederschlag, der auch vorhandenes Hämatoporphyrin enthält, ab und löst ihn nach dem Auswaschen in 15—20 ccm salzsäurehaltigem Alkohol auf. Diese Lösung untersucht man spektroskopisch. Zum Zweck weiterer Untersuchung macht man die saure Hämatoporphyrinlösung mit Ammoniak alkalisch, setzt dann Essigsäure bis zur Wiederauflösung des Phosphatniederschlags hinzu, schüttelt mit Chloroform aus, welches das Hämatoporphyrin aufnimmt und prüft die Chloroformlösung spektroskopisch.

Alloxyproteinsäure, Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure.

Diese drei Säuren sind schwefel- und stickstoffhaltig und wurden aus normalem menschlichen Harn erhalten: Die Oxyproteinsäure von R. Gottlieb und St. Bondzynski[1]), die Alloxyproteinsäure von Bondzynski und Panek[2]), die Autoxyproteinsäure von Bondzynski, Dombrowski und Panek[3]). Die von Thiele[4]) aus menschlichem Harn isolierte und Uroferrinsäure genannte Säure ist nach Bondzynski im Harn nicht vorgebildet, sondern ein Zersetzungsprodukt einer oder vielleicht mehrerer Alloxyproteinsäuren. Diese drei »Proteinsäuren« dürfen wohl als Produkte einer unvollständigen Zersetzung der Eiweißstoffe aufzufassen sein. Nach Ansicht der genannten Autoren ist durch Auffindung der Proteinsäuren im Harn die Natur des sogenannten neutralen Schwefels des Harns aufgeklärt; sie finden sich in nicht unerheblicher Menge im Menschenharn vor, z. B. die Alloxyproteinsäure in einer Menge von etwa 1,2 g in der 24stündigen Harnmenge des gesunden Menschen und Oxyproteinsäure übertrifft diejenige der Alloxyproteinsäure annähernd um das Dreifache.

Die Darstellung der drei Proteinsäuren aus Harn ist eine außerordentlich umständliche; nach richtiger Vorbereitung des Harns, nämlich nach Entfernung der Phosphorsäure mit Kalk, der Schwefelsäure mit Aetzbaryt und nach dem Ausfällen des Kalk- und Barytüberschusses mit Kohlensäure, wird der Harn im Vacuum bei 55° zum dünnen Syrup eingeengt, durch abwechselndes Einengen und Erkaltenlassen von einem großen Teil des Natriumchlorids und des Harnstoffs befreit und dann mit einem Alkoholäthergemisch (2 : 1) mehreremale ausgezogen; der in diesem Gemisch unlöslich bleibende Rückstand enthält die drei Proteinsäuren. Dieser Rückstand wird in Wasser gelöst und zur Ausfällung der Alloxyproteinsäure mit Bleiessig versetzt; der hierbei erhaltene Niederschlag dient zur Darstellung dieser Säure. Das Filtrat von der Bleiessigfällung wird, nach Entfernung des Bleis mit Natriumcarbonat, dem Neutralisieren mit Essigsäure, Einengen auf ein kleineres Volumen und schwachem Ansäuern mit Essigsäure, mit einer 20%igen Quecksilberacetatlösung versetzt und zwar so lange, als noch ein Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag enthält die Antoxyproteinsäure. Wird das essigsaure Filtrat von diesem Niederschlage mit Natriumcarbonat neutralisiert, so bildet

---

[1]) Centralblatt f. d. medizinischen Wissenschaften 1897, Nr. 33.

[2]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2959 (1902).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 83 (1905).

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 251 (1902/03).

sich auf weiteren Zusatz von Quecksilberacetatlösung wiederum ein reichlicher, weißer Niederschlag, welcher nun die Oxyproteinsäure enthält.

Antoxyproteinsäure. Aus den für das Silbersalz gefundenen Werten ist die Zusammensetzung der Antoxyproteinsäure: C 43, 21, H 4, 91, N 24, 40, S 0, 61, O 26, 33. Die Säure ist löslich in Wasser, stark rechtsdrehend, gibt weder die Biuretprobe, noch Färbung mit Millon's Reagens, überhaupt keine der charakteristischen Farbenreaktionen der Eiweißstoffe, wohl aber gibt sie die Ehrlich'sche Diazoreaktion, also die karminrote Färbung mit der Diazobenzolsulfosäure sowie mit para-Diazoacetophenom. Die Diazoreaktion gelang noch mit wenigen Milligrammen des Baryum- oder Natriumsalzes der Antoxyproteinsäure. — Auch die Schwefelbleiprobe fällt positiv aus. Bleiessig fällt die reine Säure nicht, wohl aber werden die freie Säure und ihre Salze durch Quecksilbernitrat und Quecksilberacetat ausgefällt, durch das letztere sogar aus Lösungen, die stark mit Essigsäure angesäuert sind. Die Alkalisalze, sowie das Baryum-, Calcium- und Silbersalz der Säure sind in Wasser leicht löslich; das Baryumsalz wird aus seiner wässerigen Lösung durch Alkohol zunächst in leichten Flocken gefällt, welche unter Alkohol sich in ein schweres, körniges Pulver umwanden. Auch das Silbersalz ist in Alkohol schwer löslich.

Alloxyproteinsäure ist eine sehr schwefelreiche Proteinsäure von der prozentischen Zusammensetzung C 41,33, H 5,70, N 13,55 S. 2,19, O 37,23. Diese Werte lassen sich aus der mittleren Zusammensetzung des Silbersalzes der Alloxyproteinsäure berechnen. Die freie Säure ist in Wasser und Alkohol leicht löslich und wird aus der alkoholischen Lösung auch durch Aether nicht gefällt. Im Unterschiede zur Antoxy- und Oxyproteinsäure wird die Alloxyproteinsäure durch Bleiessig gefällt, nicht aber durch Phosphorwolframsäure. Sie gibt weder Biuret-, noch Millon'sche, noch Ehrlich'sche Diazoprobe, wohl aber die Schwefelbleiprobe beim Erwärmen mit Natronlauge und wenig Bleiacetat. Das Baryumsalz ist in Wasser mit alkalischer Reaktion sehr leicht löslich und wird durch Alkohol flockig ausgefällt, das Silbersalz ist in Wasser ziemlich schwer löslich, in Alkohol.

Oxyproteinsäure enthält nach den für das Silbersalz gefundenen Analysenwerten C 39,62, H 5,64, N 18,08, S 1,12 und O 35,54 %. Oxyproteinsäure gibt weder die Biuret- noch die Xanthoproteinsäurereaktion, noch die Ehrlichsche Diazoprobe, jedoch ganz schwach die Millonsche Probe. Von den drei Proteinsäuren gibt also nur die Antoxyproteinsäure die Diazoreaktion. — Auch Phosphorwolframsäure fällt selbst konzentrierte Lösungen der Säure nicht aus. Die Alkalisalze des Baryum- und Calciumsalz der Oxyproteinsäure sind in Wasser sehr leicht löslich; die beiden letzteren Salze werden aus ihren wässerigen Lösungen durch Alkohol gefällt; die Salze sind jedoch in Alkohol weniger schwer löslich als die entsprechenden Salze der Antoxyproteinsäure. Die in Wasser gelöste Oxyproteinsäure wird von Quecksilbernitrat und Quecksilberacetat bei neutraler Reaktion gefällt, nicht aber von Bleiessig.

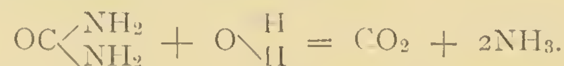
Die Oxyproteinsäure ist etwas schwefelreicher, dagegen kohlenstoff- und stickstoffärmer als die Antoxyproteinsäure. Trotz der nicht unbedeutenden Unterschiede in der Zusammensetzung scheinen die beiden Säuren nach Ansicht ihrer Entdecker einander nahe verwandt zu sein. Die Oxyproteinsäure ist wahrscheinlich eine höher oxydierte Verbindung, eine weitere Oxydationsstufe oder ein weiteres Produkt des Abbaues des Eiweißmoleküls als die Antoxyproteinsäure. Oxyproteinsäure wurde in größerer Menge im Harne von Hunden vorgefunden, die mit Phosphor vergiftet waren (Bondzynski und Gottlieb).

Harnsedimente und Harnkonkremente.

Unter Harnsediment versteht man den mehr oder weniger reichlichen Bodensatz, welcher entweder bereits im frisch gelassenen Harn sich vorfindet oder sich erst beim Stehenlassen des Harns bildet. Ein Harnsediment kann sowohl organisierte als auch nichtorganisierte Bestandteile enthalten. Die ersteren können aus Epithelien, roten und weißen Blutkörperchen, Eiterkörperchen, Harnzylindern, Bakterien, Hefepilzen, Spermatozoën bestehen; ihre Gegenwart in einem Harnsediment wird ausschließlich auf mikroskopischem Wege ermittelt. Für die chemische Untersuchung kommen nur die nicht organisierten Sedimente in Betracht. Von Substanzen, die sich häufiger in Harnsedimenten vorfinden, sind zu nennen tertiäres Calciumphosphat $Ca_3(PO_4)_2$, sekundäres Calciumphosphat $CaHPO_4 + 2H_2O$, phosphorsaure Ammoniak-Magnesia oder Trippelphosphat $Mg(NH_4)PO_4 + 6H_2O$, Calciumoxalat $C_2O_4Ca + 3H_2O$, Harnsäure und zwar als freie Säure sowie als saure Urate, verbunden mit Kalium, Natrium, Ammonium oder auch mit Calcium. Seltener oder sehr selten sind im Sediment des menschlichen Harns gefunden worden: Cystin, Xanthin, kohlensaures Calcium, schwefelsaures Calcium, Fett und Tyrosin.

Der frisch gelassene Harn des gesunden Menschen ist in der Regel klar und scheidet nach dem Erkalten beim Stehenlassen ein mehr oder weniger starkes Wölkchen, nubecula, aus, welches aus Epithelzellen, Schleimkörperchen, saurem Urat und Harnmukoid besteht. Konzentriertere Harne liefern, besonders bei Winterkälte, manchmal ein amorphes, ziegelrotes, lehmgelbes, rosarot oder braunrot gefärbtes Sediment, das sogenannte Ziegelmehlsediment, sedimentum lateritium. Von anderen Sedimenten unterscheidet sich das Ziegelmehlsediment dadurch, daß es sich bei gelindem Erwärmen, etwa auf Körpertemperatur, wieder löst. Es besteht aus sauren Uraten und kommt dadurch zustande, daß diese bei Körpertemperatur in der Harnflüssigkeit leichter löslich sind als bei niedrigeren Temperaturen.

Läßt man den Harn einige Tage oder Wochen unter Luftzutritt stehen, so wird er trübe, bedeckt sich mit einer dünnen Haut und nimmt eine alkalische Reaktion sowie einen fauligen, stinkenden Geruch an. Der Harn ist, wie man sagt, in die alkalische Gährung übergegangen, welche im wesentlichen darin besteht, daß der Harnstoff unter dem Einflusse von Bakterien, Micrococcus ureae, Bacterium ureae, in Ammoniak und Kohlensäure zerlegt wird:



$$OC\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2\end{matrix} + O\begin{matrix}\diagup H \\ \diagdown H\end{matrix} = CO_2 + 2NH_3.$$

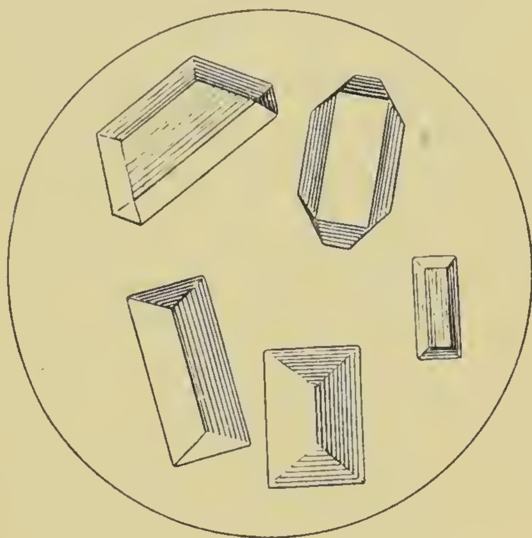
Mit dem Fortschreiten der alkalischen Gährung geht die Bildung eines Sediments im Harne Hand in Hand, indem sich besonders Trippelphosphat in glitzernden Kristallen sowie Calciumphosphat ausscheiden; auch das Auftreten von Ammoniumuratkügelchen ist für die alkalische

Gährung des Harns charakteristisch. Die dünne Haut auf dem gefaulten Harn besteht aus diesen Stoffen sowie aus einer großen Zahl von Mikroorganismen.

Beschreibung der in Harnsedimenten und Harnsteinen vorkommenden Substanzen.

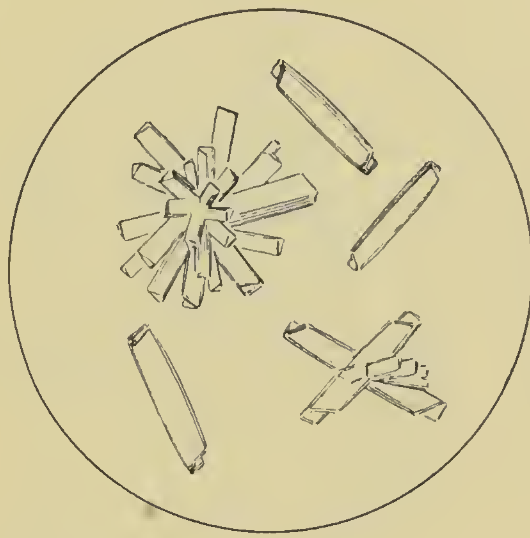
Magnesiumammoniumphosphat, phosphorsaure Ammoniak-Magnesia, Trippelphosphat $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$, findet sich nur im alkalisch reagierenden Harne vor und ist, wie bereits bemerkt wurde, für die alkalische Gährung des Harns charakteristisch. Es scheidet sich hierbei meist in ziemlich großen, glänzenden Kristallen des rhombischen Systems aus, in sog. Sargdeckelformen (Fig. 21). Die Kristalle sind unter Umständen so groß, daß sie mit bloßem Auge schon erkannt werden; sie sind in Mineralsäuren sowie in Essigsäure löslich. Durch die Löslichkeit in Essigsäure unterscheidet sich das Trippelphosphat von anderen, ebenfalls kristallisierenden Substanzen, die in Harnsedimenten vorkommen können. — In sehr seltenen Fällen hat man kristallisiertes tertiäres Magnesiumphosphat, $Mg_3(PO_4)_2 + 22H_2O$, in länglichen, cholesterinähnlichen Tafeln in Sedimenten von Menschenharn gefunden; diese Kristalle sollen stark lichtbrechend sein.

Fig. 21.



$Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$.

Fig. 22.



$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$.

Tertiäres oder neutrales Calciumphosphat, $Ca_3(PO_4)_2$, kann sich nur im alkalischen Harne ausscheiden und zwar stets amorph, als feines weißes Pulver oder in Form sehr feiner Körnchen. Es ist ebenfalls ein Bestandteil des bei der alkalischen Harngährung sich bildenden Sediments. Vom ebenfalls amorphen Ziegelmehlsediment unterscheidet sich das tertiäre Calciumphosphat dadurch, daß es ungefärbt ist, sich in Essigsäure löst, sich aber andererseits nicht löst beim Erwärmen mit dem Harn auf Bluttemperatur.

Sekundäres oder einfach saures Calciumphosphat, $CaHPO_4 + 2H_2O$, kommt im neutralen und sauren Harn vor und zwar kristallisiert, zum Teil in einzelnen oder meist in zu Drusen (Ro-

setten) angeordneten, sich kreuzenden Kristallen, die am breiteren Ende schief abgeschnitten sind (Fig. 22) Es könnte mit Harnsäure verwechselt werden, unterscheidet sich aber von dieser durch seine Löslichkeit in Säure und vom Trippelphosphat dadurch, daß es sich nur im sauer reagierenden Harne bilden kann.

Calciumkarbonat, kann sich nur im alkalischen Harne bilden und findet sich als Sediment im Menschenharn selten vor, in reichlicherer Menge aber im Pflanzenfresserharn. Das Sediment ist amorph, weiß, und besteht aus einzelnen weißen Kügelchen, die sich in Essigsäure unter Gasentwicklung lösen. Im Unterschied zu den meist gefärbten Ammoniumuratkugeln gibt es die Murexidprobe nicht.

Fig. 23.



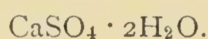

$CaSO_4 \cdot 2H_2O$.

Fig. 24.



Harnsäure.

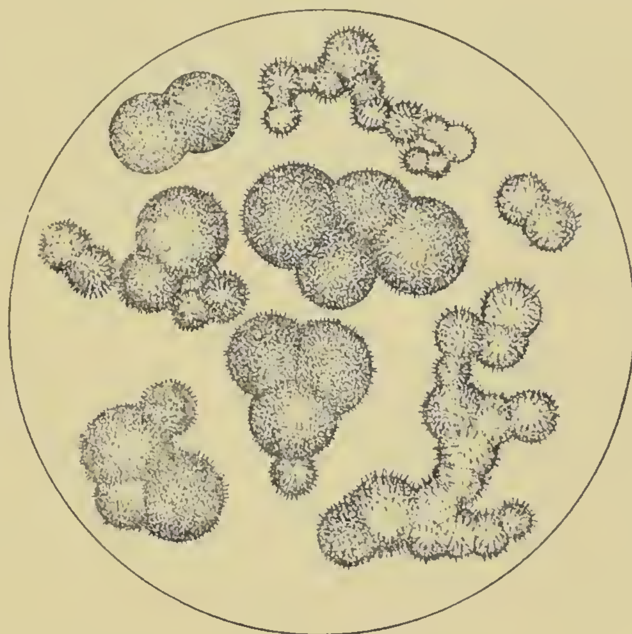
Calciumsulfat bildet sich als Sediment in stark sauren Harnen; es kommt außerordentlich selten als Sediment im Menschenharn vor und bildet dann meist zu Rosetten vereinigte, schief abgeschnittene Tafeln oder dünne, lange Nadeln (Fig. 23).

Harnsäure. Die freie Säure kommt nur im sauer reagierenden Harne vor und zwar in den verschiedenartigsten Formen kristallisiert; die Kristalle sind fast immer braun oder gelbbraun gefärbt. Es kommen häufig rhombische Tafeln oder Säulen vor, deren stumpfe Winkel meist stark abgerundet sind; oftmals sind mehrere Tafeln miteinander verwachsen. Häufig sind auch die Wetzsteinformen und die Prismen und Keile, welche oft zu Bündeln oder Rosetten vereinigt sind. Eine seltenere Form der Harnsäure ist die von Hanteln (Dumb-bells) (Fig. 24). — Die Grundform ist die vierseitige rhombische Tafel. — Harnsäure unterscheidet sich von vielen anderen Substanzen, die in Harnsedimenten vorkommen können, durch die Unlöslichkeit in Salzsäure und in Ammoniak sowie dadurch, daß sie die Murexidprobe gibt und immer gefärbt zur Ausscheidung kommt.

Saure Urate, hauptsächlich von Natrium und Kalium bilden ausschließlich oder wenigstens den Hauptbestandteil des oben erwähnten Ziegelmehlsedimentes; es tritt nur in neutralen oder sauren Harnen auf, ist stets gefärbt, und scheidet sich beim Erkalten konzentrierter Harne aus, wie beim Fieber, nach Muskelanstrengungen, starker Transpiration. Das Ziegelmehlsediment läßt auf eine größere Acidität des betreffenden Harns schließen. Es ist fast immer amorph, indem es unter dem Mikroskope aus feinen Körnchen bestehend erscheint. Beim Erwärmen mit dem Harn auf Bluttemperatur löst es sich wieder auf. Man kann das Uratsediment auch mikrochemisch nachweisen, indem man zum Präparat unter dem Mikroskop einen Tropfen Salzsäure fließen läßt, welche nach $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde die Ausscheidung der charakteristischen Harnsäurekristalle bewirkt.

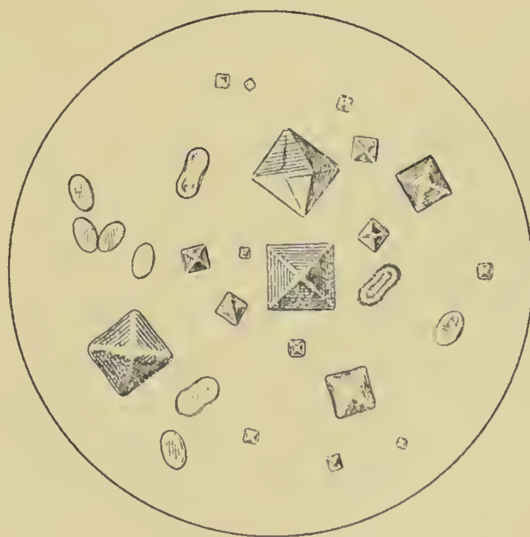
Ammoniumurat, saures harnsaures Ammonium, findet sich in reichlicher Menge im Harn bei der ammoniakalischen Gährung und ist für einen derartigen Harn charakteristisch. Im Sediment des neutralen oder gar sauren Harns ist es eine sehr seltene Erscheinung. Das Ammoniumuratsediment besteht aus gelb, rötlichbraunen oder braungefärbten, ziemlich großen, kugelförmigen Gebilden mit mehr oder weniger langen stechapfelähnlichen Auswüchsen: Stechapfelformen (Fig. 25). Es gibt die Murexidprobe, mit Salzsäure Harnsäurekristalle und entwickelt mit Kali oder Natronlauge Ammoniak, indem es gleichzeitig in Lösung geht.

Fig. 25.



Saures Ammoniumurat.

Fig. 26.

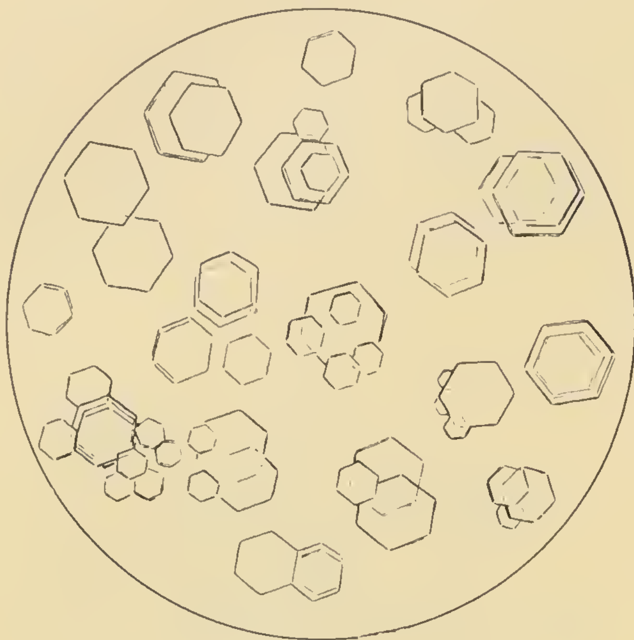


Calciumoxalat.

Calciumoxalat, oxalsaurer Kalk, kommt in saurem, neutralen und alkalischen Harne vor, ist kristallisiert; häufig sind die kleinen, glänzenden, stark lichtbrechenden Quadratoktaëder, welche an die Form von Briefkuverts erinnern und die daher auch »Briefkuvertformen« genannt werden. Seltenere For-

men sind ovale oder fast kreisrunde Scheiben mit zentraler Grube, welche bei seitlicher Betrachtung das Aussehen einer Sanduhr haben: Sanduhrformen (Fig. 26). Oxalsaurer Kalk ist löslich in Salzsäure, aber unlöslich in Essigsäure und in Ammoniak.

Fig. 27.



Cystin.

Cystin findet sich im Sediment in Form von farblosen, sechsseitigen Tafeln, ist unlöslich in Wasser, löslich in Mineralsäuren, Alkalilaugen und in Ammoniak, kristallisiert beim Verdunsten der ammoniakalischen Lösung in sechsseitigen Blättchen wieder aus (vgl. Fig. 27). Beim Kochen mit Kalilauge und wenig Bleiacetat färbt sich das Gemisch durch gebildetes Schwefelblei schwarz.

Tyrosin bildet Büschel von langen Kristallnadeln, kommt sehr selten in Sedimenten von Menschenharn vor. Beim Erwärmen mit Millons Reagens färbt sich die Mischung rot und nach einiger Zeit scheidet sich unter Umständen ein roter Niederschlag aus. Ueber andere Reaktionen vergl. den Artikel Tyrosin.

Xanthin ist löslich in Ammoniak und kristallisiert beim Verdunsten der Lösung in Gruppen von Blättchen wieder aus. Beim Verdampfen mit Salpetersäure zur Trockne bleibt ein gelber Rückstand, der sich mit Natronlauge rot und darauf beim Erhitzen purpurrot färbt.

Harnsteine oder Harnkonkremente. Entsteht ein Harnkonkrement in einem unzersetzten Harne und erfolgt auch der weitere Zuwachs in einem solchen Harne, so spricht man von einer primären Harnsteinbildung. Geht aber ein Harn in die alkalische Gährung über und fällt das hierbei frei werdende Ammoniak Trippelphosphat, Calciumphosphat und Ammoniumurat aus, so können die letzteren eine Steinbildung herbeiführen; man spricht dann von einer sekundären Steinbildung. Eine solche kann z. B. zustande kommen, wenn irgend ein Fremdkörper in die Harnblase gelangt und Veranlassung zu Blasenkatarrh mit alkalischer Harngährung gibt.

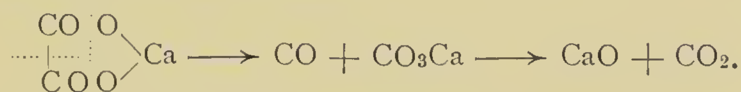
In jedem Harnstein findet sich mindestens ein Kern vor, um den sich der Stein im Wachstum abgelagert hat; manchmal sind auch mehrere Kerne vorhanden. Es kann auch vorkommen, daß die einzelnen Schichten eines Steins verschieden zusammengesetzt sind, wie dies immer der Fall ist, wenn eine primäre Harnsteinbildung in eine sekundäre übergeht. Je nach dem Material, aus welchem die Steine ausschließlich oder hauptsächlich zusammengesetzt sind, unterscheidet man Harnsäurekonkremente,

Uratsteine (Ammoniumuratsteine), Oxalatsteine, Phosphatsteine, Cystinsteine, Xanthinsteine. Außerordentlich selten sind Cholesterinsteine.

Harnsäurekonkremente sind die am häufigsten vorkommenden Harnsteine; 80% und mehr aller Konkremente sollen Harnsäurekonkremente sein. Sie sind stets gefärbt, nämlich gelblich, gelbbraun oder rotbraun und haben entweder eine ganz ebene und glatte oder eine rauhe oder kleinhöckerige Oberfläche. Ihre Größe ist verschieden, von der einer Erbse oder Bohne bis zu der eines Gänseeis. Sie sind neben den Oxalatsteinen die härtesten Blasensteine und verdanken ihre Entstehung einer primären Bildung. Es kann vorkommen, daß Schichten von Harnsäure mit solchen von Calciumoxalat abwechseln.

Die reinen Harnsteinsäuresteine hinterlassen beim Verbrennen auf dem Platinblech keinen oder nur einen unwesentlichen Rückstand. Sie geben ferner die Murexidprobe und entwickeln mit kalter, stark verdünnter Natronlauge höchstens Spuren von Ammoniak.

Calciumoxalatsteine kommen nach den Harnsäurekonkrementen am häufigsten vor und sind entweder klein und von glatter Oberfläche: Hanfsamensteine, oder erheblicher größer, bis zur Größe eines Hühnereis, und haben eine rauhe, höckerige, manchmal mit Zacken besetzte Oberfläche: Maulbeersteine. Sie sind außerordentlich hart; ihre Oberfläche ist durch zersetzten Blutfarbstoff manchmal dunkelbraun gefärbt. Infolge ihrer rauhen Oberfläche können sie Veranlassung zu Blutungen geben. Sie werden von Essigsäure nicht gelöst, wohl aber nach gelindem Glühen und zwar unter Kohlensäureentwicklung; nach starkem Glühen über dem Gebläse bleibt Calciumoxyd zurück, ein weißes, nach dem Befeuchten alkalisch reagierendes, in Essigsäure lösliches Pulver:



$$\begin{matrix} CO\,O \\ | \\ COO \end{matrix} \!\!\! > Ca \longrightarrow CO + CO_3Ca \longrightarrow CaO + CO_2.$$

Phosphatsteine entstehen sekundär im alkalisch reagierenden Harne und bestehen in der Regel aus Trippelphosphat und Calciumphosphat, gemengt manchmal mit etwas Ammoniumurat und Calciumoxalat. Sie besitzen meist eine weiße Farbe und rauhe Oberfläche, blättern meist leicht ab und sind weich und zerreiblich. Ihre Lösung in Säuren gibt die Reaktionen der Phosphorsäure, des Calciums und meist auch des Magnesiums. Enthalten die Phosphatsteine Trippelphosphat oder Ammoniumurat, so entwickeln sie mit kalter Kalilauge Ammoniak.

Cystinsteine kommen selten vor, sind von sehr wechselnder Größe, können aber die Größe eines Hühnereies erreichen; sie sind weiß oder gelblichweiß, wenig hart, mit glatter oder höckeriger Oberfläche. Die Bruchfläche ist kristallinisch. Auf einem Platinbleche erhitzt, verbrennen sie vollständig und zwar mit bläulicher Flamme.

Xanthinsteine sind sehr selten, entstehen primär, sind von verschiedener Größe, weißlich, gelbbraun oder zimmtbraun, mäßig hart. Beim Reiben nehmen sie Wachsglanz an. Sie bestehen meist aus reinem

Xanthin und verbrennen daher, auf einem Platinbleche erhitzt, vollständig. Man führe eine Xanthinprobe aus.

Mikroskopische Untersuchung der Harnsedimente und Untersuchung derselben auf einem Platinblech.

Hat sich in dem zu untersuchenden Harne nicht schon ein Sediment abgeschieden, und ist er trübe, so läßt man ihn in einem Spitzkelche einige Minuten bis Stunden sedimentieren und gießt dann die über dem Sedimente stehende Flüssigkeit möglichst klar ab. Mit Hilfe einer Pipette bringt man dann einen Tropfen der das Sediment enthaltenden Flüssigkeit auf einen Objektträger, legt ein Deckgläschen darauf und untersucht es bei ca. 300facher Vergrößerung mit dem Mikroskope. Führt man diese mikroskopische Untersuchung gründlich aus, so wird man in den allermeisten Fällen die einzelnen Bestandteile des Sediments angeben können. — Ist eine eingehendere chemische Untersuchung des Sediments notwendig, so führt man zunächst eine Vorprobe auf einem Platinbleche aus, indem man eine kleinere Probe des Sediments vorsichtig erhitzt. Verbrennt hierbei das Sediment vollständig oder nahezu vollständig, so daß kein oder nur ein sehr geringer Rückstand bleibt, so besteht es nur aus organischem Material, wie Harnsäure, Cystin, Xanthin; hinterbleibt aber nach vollständigem Verbrennen der Kohle Asche, so ist neben organischem auch anorganisches Material zugegen. Man untersuche das Sediment nach dem folgenden Gange chemisch.

Chemische Untersuchung der Harnsedimente und Harnsteine.

Man kocht eine größere Menge des fein zerriebenen Sediments oder Konkrements mit Wasser aus, filtriert heiß ab und wäscht einen hierbei ungelöst bleibenden Teil mit kochendem Wasser aus. Das Filtrat (F) kann saure Alkaliurate, schwefelsaures Calcium, phosphorsaure Ammoniak-Magnesia sowie eine Spur freie Harnsäure und der Filterrückstand (R) kann die übrigen Bestandteile von Harnsedimenten und Konkrementen enthalten.

1. Filtrat F. — Das erhaltene Filtrat (F) wird samt Waschwasser in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade auf einige ccm eingedampft, dann Salzsäure zugesetzt — und zwar gleichgültig, ob sich ein Niederschlag darin befindet oder nicht — und einige Stunden, am besten über Nacht, stehen gelassen. Ein hierbei sich bildender kristallinischer Niederschlag wird abfiltriert und mittels der Murexidprobe auf Harnsäure untersucht. — Das Filtrat teile man in zwei Teile

Den einen Teil deses Filtrats von der kristallinischen Ausscheidung (Harnsäure) bringt man zur Prüfung auf einen Gehalt an Ammoniak in einem Uhrglase mit kalter verdünnter Natronlauge im Ueberschusse zusammen, bedeckt dieses Uhrglas sofort mit einem zweiten, gut auf das erste passenden Uhrglase und preßt die beiden Uhrgläser mit einem Halter fest zusammen. In dem oberen Uhrglase hat man schon vorher

ein mit einem Tropfen Wasser befeuchtetes rotes Lackmuspapier ausgebreitet. Das Lackmuspapier färbt sich innerhalb weniger Minuten blau, wenn das Filtrat Ammoniak enthält. — Den zweiten Teil des Filtrats verdampft man auf dem Wasserbade zur Trockene, durchrührt einen bleibenden Rückstand mit Ammoniakflüssigkeit und filtriert ab. Das hierbei erhaltene Filtrat wird abgedampft, der Verdampfungsrückstand gelinde geglüht, dann mit Natriumkobaltinitrit und mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure auf Kalium und mit Kaliumpyroantimoniat auf Natrium geprüft. Auch die Untersuchung mit dem Spektralapparate auf Kalium und Natrium ist angebracht. Der Teil, der sich in der Ammoniakfüssigkeit nicht gelöst hat, kann aus schwefelsaurem Calcium und phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia bestehen. Er wird in verdünnter Salpetersäure gelöst; ein Teil dieser Lösung wird mit Chlorbaryum auf Schwefelsäure, ein zweiter Teil mit Molybdatreagens auf Phosphorsäure geprüft.

2. Filterrückstand R. Der in heißem Wasser unlösliche Rückstand (R) des Sediments oder Konkrements wird mit verdünnter Salzsäure übergossen; erfolgt hierbei ein Aufbrausen von Kohlendioxyd, so ist ein Karbonat, also Calciumkarbonat, vorhanden. Man läßt unter häufigem Umschütteln kurze Zeit stehen, filtriert ab, wäscht einen bleibenden Rückstand mit Wasser aus und untersucht sowohl die salzsaure Lösung (a) als auch den Rückstand (b).

a) Die salzsaure Lösung (a) kann Calcium, Magnesium, Eisen, Ammonium, Phosphorsäure, Oxalsäure, Cystin enthalten. Ein kleinerer Teil dieser Lösung wird auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen eingedampft, dann in der oben angegebenen Weise auf Ammoniak untersucht. Läßt sich dieses nachweisen, so kann es von harnsaurem Ammonium wie auch von Trippelphosphat herrühren. — Der größere Teil der salzsauren Lösung wird mit überschüssigem Ammoniak versetzt (Lackmuspapier), ein gebildeter Niederschlag nach kurzem Stehen abfiltriert und mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen.

Ein Teil des hierbei erhaltenen ammoniakalischen Filtrats wird mit Ammoniumoxalat auf Calcium und, falls ein Niederschlag entsteht, im Filtrate von diesem, sonst direkt, mit Natriumphosphat auf Magnesium geprüft. Das hierbei gefundene Calcium und Magnesium war im Sediment oder Konkrement als kohlensaures Salz vorhanden. — Den Rest des ammoniakalischen Filtrats läßt man eindunsten und untersucht Kristalle, die sich hierbei ausscheiden, unter dem Mikroskope, ob sich die für Cystin charakteristischen sechsseitigen Blättchen darunter vorfinden.

Der mit Ammoniak aus der salzsauren Lösung des Sediments oder Konkrements entstandene Niederschlag — eventuell Calciumoxalat, Calcium-, Magnesium-, Ferriphosphat — wird mit verdünnter Essigsäure gelinde erwärmt; ungelöst bleibt hierbei oxalsaures Calcium[1]). Die filtrierte essigsaure Lösung versetzt man mit Ammonium-

[1]) Zur Identifizierung des in Essigsäure unlöslichen Rückstandes als

oxalat; hierdurch wird dasjenige Calcium gefällt, welches im Untersuchungsmaterial als phosphorsaures Calcium vorhanden war. Man filtriert nach einiger Zeit durch ein Doppelfilterchen ab, versetzt das klare Filtrat mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion und schüttelt tüchtig durch; entweder sofort oder nach einigem Stehen scheidet sich ein sandiger, kristallinischer Niederschlag aus, wenn das Untersuchungsmaterial Magnesiumphosphat oder Magnesiumammoniumphosphat enthalten hat.

b) Der in Salzsäure unlösliche Teil des Rückstandes R (b) des Sediments oder Konkrements kann aus Harnsäure, Xanthin sowie aus Epithelzellen und anderen organischen Stoffen bestehen.

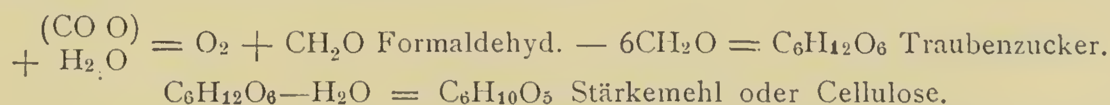
Zur Trennung von Harnsäure und Xanthin durchschüttelt man den Rückstand mit Ammoniak, wobei Harnsäure als saures Ammoniumurat ungelöst bleibt (Murexidprobe), während Xanthin in Lösung geht. Mit dem Verdunstungsrückstand der ammoniakalischen Lösung führt man eine Xanthinprobe aus.

Calciumoxalat filtriere man ab, wasche aus und glühe den Rückstand in einem Tiegel; der hierbei bleibende Glührückstand muß in verdünnter Essigsäure löslich sein und diese essigsaure Lösung muß durch Ammoniumoxalat gefällt werden, falls das Untersuchungsmaterial oxalsaures Calcium enthalten hat.

Anhang.

Ueber synthetische Prozesse im Tierkörper und die Ausscheidung organischer Substanzen mit dem Harn.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß im allgemeinen genommen, ein gewisser quantitativer Unterschied besteht zwischen den chemischen Prozessen, die sich im Tierkörper und denjenigen, die sich in der Pflanze abspielen. Die Pflanze ist imstande, aus einigen einfachen, energiearmen, ihr als Nährstoffe dienenden Substanzen, wie aus Wasser, Kohlensäure, Ammoniaksalzen, salpetersauren Salzen und einigen anderen Mineralstoffen, kompliziert zusammengesetzte, hochmolekulare, energiereiche Verbindungen aufzubauen. Mit Hilfe von einfachen Bausteinen stellt also die Pflanze in ihrem Organismus Fette, Kohlenhydrate, organische Säuren, Alkaloide, Harze und Eiweißstoffe her. Die chemischen Prozesse des Pflanzenorganismus bestehen somit, wenigstens der Hauptsache nach, aus *Synthesen*, insofern man unter einer Synthese den Aufbau von komplizierter zusammengesetzten Substanzen aus einfacher zusammengesetztem und aus den Elementen erhältlichem Material versteht. Neben diesen Synthesen kommen in der Pflanze im großen Umfange *Reduktionsprozesse* vor. Unter dem Einflusse des Sonnenlichtes wird im Chlorophyll des Protoplasmas der Pflanze aus aufgenommenem Kohlendioxyd und Wasser *Sauerstoff* frei, ein *Reduktionsvorgang*, der als Ausgangspunkt für verschiedene Synthesen angesehen wird. Nach einer von A. v. *Baeyer*[1]) aufgestellten Hypothese soll durch Reduktion von Kohlensäureanhydrid und Wasser zunächst Formaldehyd entstehen und dieser sich dann zu einem Zucker, z. B. Traubenzucker polymerisieren, aus welchem durch Wasserabspaltung andere Kohlehydrate wie Stärkemehl und Cellulose entstehen könnten:



$$\left.\begin{matrix} CO\,O \\ +\ H_2O \end{matrix}\right\} = O_2 + CH_2O \text{ Formaldehyd.} \quad — \quad 6CH_2O = C_6H_{12}O_6 \text{ Traubenzucker.}$$

$$C_6H_{12}O_6 - H_2O = C_6H_{10}O_5 \text{ Stärkemehl oder Cellulose.}$$

Berücksichtigt man auch die Energieverhältnisse, so findet man, daß die Pflanze in ihrem Organismus aus energiearmem Material wie Wasser, Kohlensäure und Ammoniak, *energiereichere* organische Substanzen aufbaut. Die Assimilationsprozesse in der Pflanze vollziehen sich also auf die Weise, daß die freie, strahlende Energie der Sonne gebunden und in einer

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 3.

neuen Energieform, nämlich als chemische Energie, in denjenigen organischen Verbindungen aufgespeichert wird, welche durch eine Reduktionssynthese in der Pflanze entstanden sind.

Die in der Pflanze durch Reduktionssynthesen hervorgegangenen drei Hauptgruppen von organischem Nährmaterial, die Fette, Kohlehydrate und Eiweißstoffe, dienen dem Tierkörper als Nahrungsstoffe. Dieses Nährmaterial wird nun im Tierkörper der Hauptsache nach verbrannt; es unterliegt hydrolytischen Spaltungen und Oxydationen, durch welche schließlich als wesentlichste Endprodukte des tierischen Stoffwechsels Kohlensäure, Wasser und einfach zusammengesetzte Ammoniakderivate wie Harnstoff entstehen, also ausschließlich energiearme Substanzen. Man kann also sagen, daß in der Pflanze der Hauptsache nach Reduktionsprozesse und Synthesen verlaufen, durch welche unter dem Einflusse des Sonnenlichtes kompliziert zusammengesetzte, hochmolekulare Verbindungen mit großem Energieinhalte entstehen, während sich im Organismus des Tieres umgekehrt vorwiegend hydrolytisch verlaufende Prozesse, also Spaltungen, und Oxydationsprozesse abspielen, wodurch energiearme, einfach zusammengesetzte Abbauprodukte, die Hauptbestandteile der Pflanzennahrung, hervorgehen.

Man darf aber nicht etwa einen scharfen Gegensatz annehmen zwischen dem Chemismus des Tier- und Pflanzenkörpers. Auch in der Pflanze verlaufen Oxydationen. Wie für die Tiere ist bekanntlich auch für die Pflanze der Sauerstoff unentbehrlich; auch die Pflanze atmet, nimmt Sauerstoff auf und scheidet Kohlensäure aus.

Dadurch, daß man in systematischer Weise Tieren organische Verbindungen bestimmter Konstitution eingegeben und den während der Versuchsperiode von den betreffenden Tieren abgesonderten Harn untersucht hat, hat man die verschiedenen chemischen Prozesse, die im Tierkörper verlaufen können, genau kennen gelernt. Man hat auf diese Weise gefunden, daß im Tierorganismus nicht nur Oxydationen und hydrolytische Spaltungen, sondern auch Reduktionsprozesse und recht zahlreiche Synthesen vorkommen. Die wichtigeren dieser Synthesen sind im folgenden kurz zusammengestellt; die meisten derselben kommen in der Weise zustande, daß eine dem Körper einverleibte organische Substanz, direkt oder nach vorausgegangener chemischer Umwandlung, Oxydation oder Reduktion, sich mit einer vom Organismus gelieferten Substanz paart, meist unter Austritt von Wasser, und daß die aus diesen beiden Paarlingen neu hervorgegangene gepaarte Substanz mit dem Harn ausgeschieden wird. Der Zweck dieser Tiersynthesen dürfte ein verschiedener sein; in manchen Fällen, wie bei den Phenolen, dürfte die Paarung mit Schwefelsäure und Glukuronsäure den Zweck der Entgiftung haben; in anderen Fällen wird eine eingeführte schwer lösliche Substanz durch eine Synthese in eine löslichere Verbindung übergeführt, die dann rascher zur Ausscheidung gelangen kann, als die eingeführte Substanz. Auf jeden Fall wird der

tierische Körper das Bestreben haben, irgendwelche zugeführte körperfremden Substanzen, zumal wenn sie Schädlinge für den Organismus sind, so bald wie möglich wieder auszuscheiden.

1. Hippursäuresynthese. Wöhler hat im Jahre 1824 als erster gefunden, daß in den Magen eines Menschen oder eines Hundes eingeführte Benzoësäure nach einer Paarung mit Glykokoll, das vom Organismus geliefert wird, im Harne als Hippursäure erscheint:



$$C_6H_5 \cdot CO\,OH + H\,NH \cdot CH_2 \cdot COOH = H_2O + C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH.$$

Solche Paarungen mit Glykokoll gehen im Tierorganismus sehr viele aromatische Säuren ein; die substituierten Benzoësäuren und die höheren Homologen, die mit Glykokoll gepaart ausgeschieden werden, sind die folgenden: o-, m-Chlorbenzoësäure $ClC_6H_4.COOH$, m-Brombenzoësaure $BrC_6H_4.COOH$, m-Nitrobenzoësäure $NO_2.C_6H_4.COOH$, o-, m-, p-Toluylsäure $CH_3.C_6H_4.COOH$, o-, m-, p-Fluorbenzoësäure $F.C_6H_4.COOH$. — Salicylsäure $HO.C_6H_4.COOH$ wird zum Teil als solche, teils mit Glykokoll gepaart, als Salicylursäure $HO.C_6H_4$ $CO.NH.CH_2.COOH$ ausgeschieden. — In vielen Fällen muß die dem Organismus zugeführte aromatische Substanz erst zu Benzoësäure oxydiert werden und wird dann ganz oder teilweise als Hippursäure ausgeschieden. Dies ist festgestellt für die Phenylpropionsäure $C_6H_5.CH_2.CH_2.COOH$ und die Zimmtsäure $C_6H_5.CH:CH.COOH$, während die Phenylessigsäure $C_6H_5-CH_2.COOH$ bei Hunden und Kaninchen keine Oxydation erleidet, sondern nach Paarung mit Glykokoll als Phenacetursäure $C_6H_5.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$ den Organismus verläßt.

Phenylbuttersäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ und Phenylisokrotonsäure $C_6H_5 \cdot CH:CH \cdot CH_2 \cdot COOH$ werden erst zu Phenylessigsäure oxydiert und als Phenacetursäure ausgeschieden, während die Phenylvaleriansäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ gerade so wie die Phenylpropionsäure zunächst in Benzoësäure übergeht und demnach als Hippursäure im Harn erscheint.

Nach Knoop gilt die Regel, daß die aromatischen Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffkette wie Phenylbuttersäure und Phenylkapronsäure zu Phenylessigsäure oxydiert und demnach als Phenacetursäure ausgeschieden werden, während die Säuren mit ungerader Kohlenstoffkette wie Phenylpropionsäure und Phenylvaleriansäure in Benzoësäure übergehen und daher als Hippursäure zur Ausscheidung gelangen.

Auch aromatische Kohlenwasserstoffe mit einer Seitenkette können unter Oxydation der Seitenkette zu Benzoësäure oxydiert und als Hippursäure ausgeschieden werden; so verhalten sich Toluol $C_6H_5 \cdot CH_3$, Aethylbenzol $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_3$ sowie Propylbenzol $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_3$. Sind mehrere Seitenketten vorhanden, so wird stets nur eine derselben zu Karboxyl oxydiert; so wird Xylol $C_6H_4(CH_3)_2$ zu Toluylsäure $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot COOH$ oxydiert und nach der Paarung mit Glykokoll als Tolursäure $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$ ausgeschieden.

Benzaldehyd $C_6H_5 \cdot CH:O$ wird im Tierkörper ebenfalls zu Benzoësäure oxydiert und gelangt als Hippursäure zur Ausscheidung. Nebenbei erfolgt aber eine Reduktion des Benzaldehyds zu Benzylalkohol $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot OH$, der als gepaarte Glukuronsäure ausgeschieden wird (s. unten).

Bemerkenswert ist das Verhalten der Chinasäure $C_6H_7(OH)_4COOH$; diese wird im menschlichen Organismus zu Benzoësäure reduziert



$$C_6H_7(OH)_4COOH + 2H = 4H_2O + C_6H_5 \cdot COOH$$

und als Hippursäure ausgeschieden.

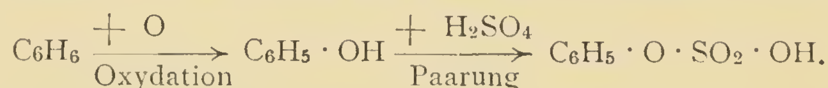
2. Die Synthesen der aromatischen Aetherschwefelsäuren oder gepaarten Schwefelsäuren. Diese Synthesen verlaufen in der Weise, daß ein dem Tierkörper einverleibtes Phenol oder Phenolderivat sich mit saurem schwefelsaurem Kalium, das vom Organismus geliefert wird, paart, und daß das Kaliumsalz dieser gepaarten Schwefelsäure mit dem Harn ausgeschieden wird. So wird dem Tierkörper innerlich oder äußerlich appliziertes Phenol, größtenteils als Kaliumsalz der Phenolschwefelsäure ausgeschieden (E. Baumann):



$$C_6H_5OH + HO \cdot SO_2 \cdot OK = H_2O + C_6H_5 \cdot O \cdot SO_2 \cdot OK = \text{Phenolschwefelsaures Kalium.}$$

Wie das Phenol verhalten sich die meisten Phenole, wie die drei Kresole, $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot OH$, die mehr oder weniger vollständig als Kresolätherschwefelsäuren eliminiert werden, ferner Thymol $C_6H_3(CH_3)(C_3H_7)(OH)$, Guajakol $CH_3 \cdot O \cdot C_6H_4 \cdot OH(1,2)$, die zweiwertigen Phenole Brenzkatechin, Resorcin und Hydrochinon $C_6H_4(OH)_2$ sowie Eugenol $CH_2:CH \cdot CH_2 \cdot C_6H_3(OCH_3)(OH)$.

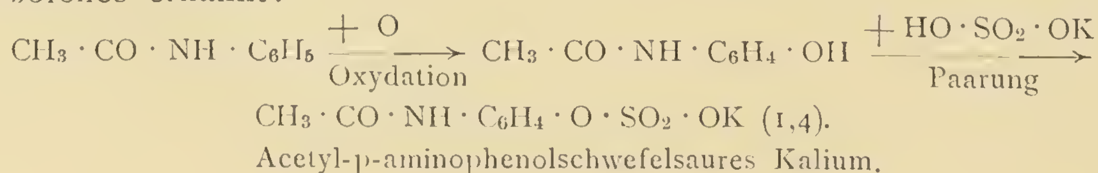
Enthält eine dem Tierkörper zugeführte aromatische Substanz kein Phenolhydroxyl, so wird häufig erst ein solches vor der Paarung durch Oxydation gebildet. So geht eingeführtes Benzol C_6H_6 beim Menschen und Hunde in den Harn als Phenolschwefelsäure über:



$$C_6H_6 \xrightarrow[\text{Oxydation}]{+\,O} C_6H_5 \cdot OH \xrightarrow[\text{Paarung}]{+\,H_2SO_4} C_6H_5 \cdot O \cdot SO_2 \cdot OH.$$

Die Oxydation des Benzols geht sogar z. T. weiter, beim Hunde zum Brenzkatechin und beim Menschen zum Hydrochinon.

Acetanilid $C_6H_5 \cdot NH \cdot CO \cdot CH_3$ verhält sich ähnlich wie Benzol. Beim Menschen wird das eingeführte Acetanilid wohl zum Teil in Acetyl-p-aminophenol, zum Teil auch unter Abspaltung der Acetylgruppe in p-Aminophenol verwandelt, welche mit Schwefelsäure wie auch mit Glukuronsäure (s. u.) gepaart, ausgeschieden werden. Das Kaliumsalz der Acetyl-p-aminophenolschwefelsäure wurde von Mörner aus Antifebrinharn isoliert und durch die Analyse und den Nachweis der Spaltungsprodukte als solches erkannt:

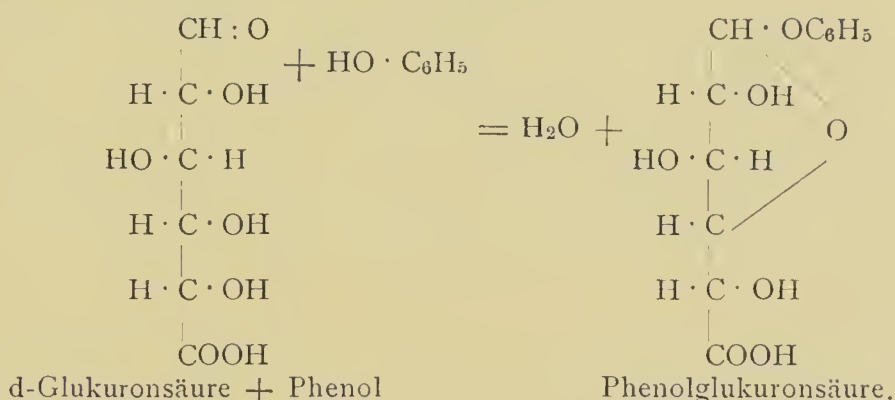


$$CH_3 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5 \xrightarrow[\text{Oxydation}]{+\,O} CH_3 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot OH \xrightarrow[\text{Paarung}]{+\,HO \cdot SO_2 \cdot OK}$$

$$CH_3 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot O \cdot SO_2 \cdot OK \; (1,4).$$

Acetyl-p-aminophenolschwefelsaures Kalium.

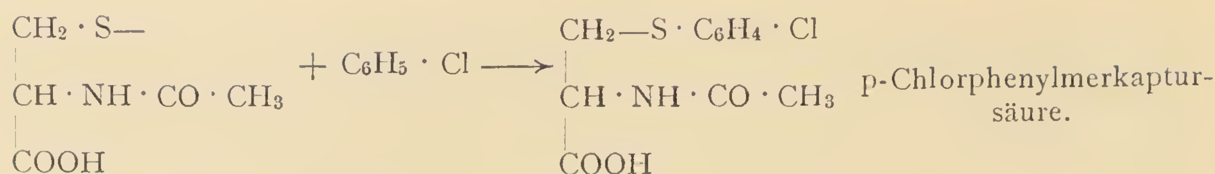
3. Die Synthesen der gepaarten Glukuronsäuren. Eine Paarung mit Glukuronsäure $COOH(CHOH)_4CHO$ kommt im Tierkörper sehr häufig vor; durch eine derartige Paarung wird die Glukuronsäure vor der Oxydation geschützt; es sind besonders Hydroxylhaltige Substanzen wie substituierte und nicht substituierte Alkohole und Phenole mit ihren vielen Derivaten, welche sich im Tierkörper leicht mit Glukuronsäure paaren und als linksdrehende gepaarte Glukuronsäuren mit dem Harne ausgeschieden werden. Auch verschiedene Aldehyde und Ketone verhalten sich ähnlich; nur müssen diese vor ihrer Paarung zu den entsprechenden primären und sekundären Alkoholen reduziert werden. Auch aromatische Kohlenwasserstoffe, zyklische Terpene und Kampfer gehen im Tierkörper nach vorausgegangener Oxydation oder Hydratation, wodurch Hydroxylderivate entstehen, in gepaarte Glukuronsäuren über.



d-Glukuronsäure + Phenol — Phenolglukuronsäure.

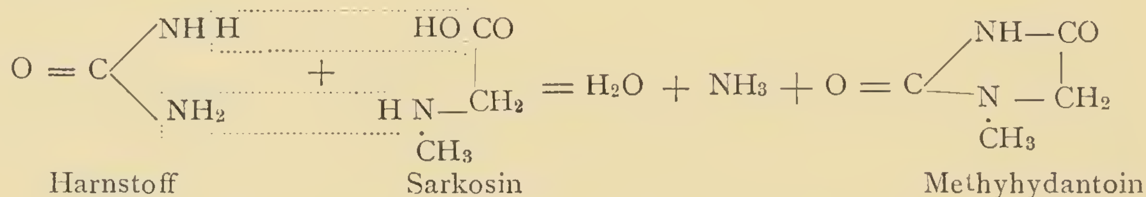
Der Aldehyd Chloralhydrat $CCl_3 \cdot CHO + H_2O$ wird durch Reduktion erst in Trichloräthylalkohol $CCl_3 \cdot CH_2 \cdot OH$ übergeführt, der sich dann mit Glukuronsäure zu Urochloralsäure = Trichloräthylglukuronsäure paart. Von Alkoholen lieferten der Isobutylalkohol relativ große Mengen gepaarter Glukuronsäure; besonders sekundäre Alkohole paaren sich in reichlicherer Menge, wenigstens beim Kaninchen mit Glukuronsäure. Von bekannteren Substanzen und Arzneimitteln sind nach Einführung von Kampfer, Borneol, Menthol, Terpenen, Naphtalin und Antipyrin gepaarte Glukuronsäuren im Harne nachgewiesen worden.

4. Die Synthesen der Merkaptursäuren (E. Baumann). Nach Verfütterung von halogensubstituierten Benzolen, nämlich von Chlorbenzol C_6H_5Cl, Brombenzol C_6H_5Br und Jodbenzol C_6H_5J an Hunde treten im Harn der Versuchstiere schwefel-, stickstoff- und halogenhaltige Verbindungen auf, die den Komplex des acetylierten Cystins und der Glukuronsäure enthalten. Diese Komplexverbindungen werden schon in der Kälte durch Säuren oder Alkalien oder auch bei längerem Erhitzen des Harns gespalten in linksdrehende Glukuronsäure und eine »Merkaptursäure«. Die Merkaptursäuren kommen in der Weise zustande, daß sich das eingeführte Halogenbenzol mit dem von Tierkörpern gelieferten acetylierten Cystinrest paart:

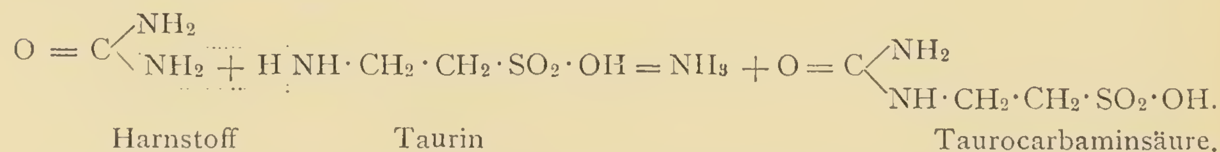


Durch Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren spalten die Merkaptursäuren Essigsäure ab, und es entsteht ein Cystein, in welchem der Wasserstoff der SH-gruppe durch ein halogensubstituiertes Phenyl ersetzt ist.

5. Synthese des Hydantoins und der Taurokarbaminsäure. Die Aminosäuren der Fettreihe, nämlich Glykokoll, Leucin, Asparaginsäure, geben unter Zersetzung zu einer vermehrten Harnstoffausscheidung Veranlassung. Die Fähigkeit des Organismus, die Aminosäuren zu zersetzen, hat aber ihre Grenzen (Salkowski); z. B. enthielt bei einer Zufuhr von 14,6 g Glykokoll beim Hunde und von 14,2 g beim Kaninchen der Harn unverändert gebliebenes Glykokoll. Wesentlich schwerer zersetzlich als die obigen Aminosäuren ist das Sarkosin oder Methylglykokoll $CH_3 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$. Es geht zum großen Teil unverändert in den Harn über (Baumann, v. Mering), zum geringeren Teil geht es eine Paarung, Synthese, mit Harnstoff ein, indem unter Austritt von Ammoniak und Wasser Methylhydantoin entsteht (Salkowski)[1]):

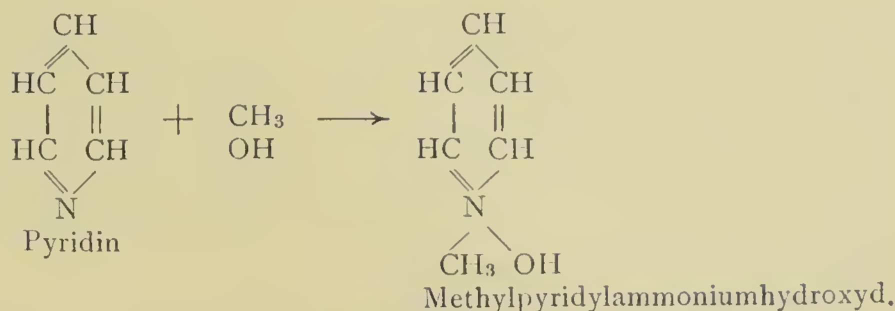


Das schwer verbrennliche Taurin $H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_2 . OH$ verhält sich im Organismus des Menschen und des Hundes dem Sarkosin ähnlich, indem es teils unverändert, teils mit Harnstoff gepaart als Taurocarbaminsäure in den Harn übergeht; bei dieser Synthese tritt nur Ammoniak aus:



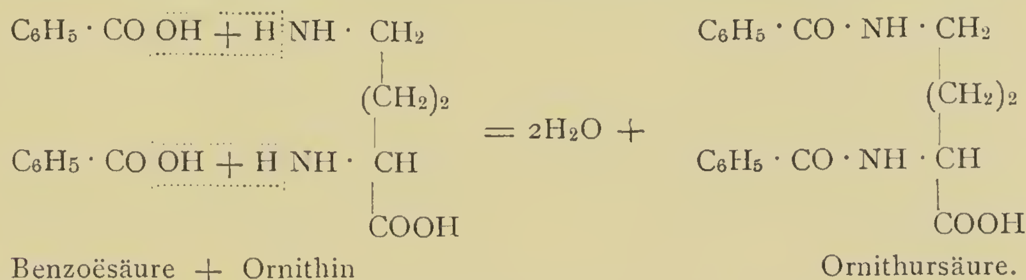
6. Synthese des Methylpyridylammoniumhydroxyds. Pyridin C_5H_5N verbindet sich weder mit Schwefelsäure noch mit Glukurosäure, nach etwa vorausgegangener Oxydation; es nimmt, wie His[2]) gefunden hat, ein Molekül Methylalkohol, d. h. Methyl und Hydroxyl, auf, wenn es Hunden verfüttert wird, und wird demnach als eine Ammoniumbase, als Methylpyridylammoniumhydroxyd, ausgeschieden. Cohn hat diesen Befund später bestätigen können:

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 100 (1879).
[2]) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 22, 253 (1887).

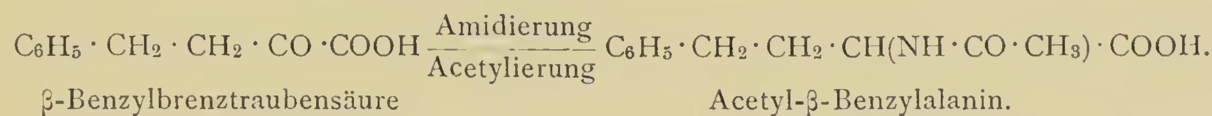


His konnte freies, unverändert gebliebenes Pyridin im Harndestillat nicht nachweisen, während das Pyridin beim Kaninchen unverändert in den Harn übergeht.

7. Synthese der Ornithursäure. Werden Hühner oder andere Vögel mit Benzoësäure gefüttert, so erscheint diese im Harn nicht als Hippursäure, sondern als Ornithursäure. Diese entsteht durch Paarung von zwei Molekülen Benzoësäure mit 1 Molekül Ornithin oder α-, δ-Diaminovaleriansäure unter Austritt von 2 Molekülen Wasser (Jaffé)[1].



8. Synthese einer Aminosäure, des Acetyl-β-Benzylalanins. Die Fähigkeit des tierischen Organismus zu acetylieren, also eingeführte Substanzen als Acetylprodukte auszuscheiden, ist schon längere Zeit bekannt; z. B. sind die Merkaptursäuren (s. oben) acetylierte Cysteïnderivate. Anders verhält es sich mit der Bildung einer acetylierten Aminosäure im Tierkörper des Hundes nach Verfütterung von einer stickstofffreien Säure. F. Knoop[2]) hat nach Verfütterung von 10 g β-Benzylbrenztraubensäure 0,25 g des prächtig kristallisierenden Acetylderivates des β-Benzylalanins oder der γ-Phenyl-α-aminobuttersäure erhalten:



Die erhaltene Substanz war optisch aktiv, nämlich rechtsdrehend, und lieferte bei der Abspaltung des Acetylrestes die γ-Phenyl-α-aminobuttersäure, $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$.

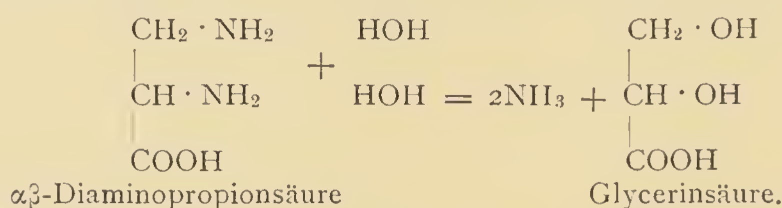
Es liegt nun die Frage sehr nahe, ob auch unter normalen Verhältnissen, wenn also keine Fremdstoffe dem Körper zugeführt werden, Synthesen im tierischen Körper verlaufen? Diese Frage ist zu bejahen. Solche Synthesen vollziehen sich auch normalerweise im großen Umfange im tierischen Organismus und sind zum Teil für das Tierleben

[1]) Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 10, 1925 (1877).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 489 (1910).

von der allergrößten Bedeutung. Es sei nur hingewiesen auf die *Neubildung des roten Blutfarbstoffes*, des Hämoglobins, einer aus Hämatin und Globulin gepaarten Eiweißsubstanz, ferner auf die *Fettbildung aus Kohlehydraten*, welche sich zweifelsohne im großen Maßstabe im Tierkörper vollzieht und ein schönes Beispiel für einen normal darin verlaufenden *Reduktionsprozeß* ist. Endlich sei die Bildung verschiedener *Eiweißstoffe* aus einfacher zusammengesetzten Stoffen erwähnt, die sicher im tierischen Organismus stattfindet.

Desamidierung im Tierkörper. Außer Oxydationen, hydrolytischen Spaltungen, Reduktionen und Synthesen sind auch solche Prozesse im Tierkörper beobachtet worden, durch welche *Aminogruppen* eliminiert werden: *Desamidierung.* Beispielsweise spaltet die *α-β-Diaminopropionsäure* im Kaninchenleibe ihre beiden Amidogruppen ab unter Bildung von *Glyzerinsäure* (*Paul Mayer*)[1]:



Wie aus dieser Gleichung zu ersehen ist, gehören die *Desamidierungen* streng genommen zu den *Hydrolysen*.

Die kolorimetrische Bestimmung des Jods im jodhaltigen Harn und Magensaft, in der Schilddrüse und anderen jodhaltigen Organen mit dem Autenrieth-Koenigsberger'schen Kolorimeter.

Liegt ausschließlich *anorganisch*, also ionogenes Jod vor, so wird man in vielen Fällen das aus einem Harn oder aus Magensaft durch Alkalinitrit und verdünnter Schwefelsäure frei gemachte Jod mit Chloroform ausschütteln und den kolorimetrischen Wert der gemessenen Jod-Chloroformlösung im oben genannten Kolorimeter direkt bestimmen können. — Kann sich aber das Jod auch in *organischer* Bindung vorfinden, oder ist der Harn oder Magensaft stark gefärbt, z. B. durch Blut oder Gallenfarbstoff, so ist eine Zerstörung des organischen Materials durch einen Schmelzprozeß unerläßlich, wie dies bei der Untersuchung der Schilddrüse und anderer Organe immer notwendig ist. — Zu dem Zweck verdampft man 10 ccm oder mehr Harn nach Zusatz von 1 g reinem Natriumkarbonat und 2 bis 3 g reinem Salpeter in einer Platinschale oder einem geräumigen Nickeltiegel auf dem Wasserbade zur Trockne und glüht den Rückstand nur *gelinde* über der einfachen Bunsenflamme und nur so lange, bis eben alle Kohlenteilchen verschwunden sind und eine rein weiße Schmelze entstanden ist. Diese löst man nach dem Erkalten in Wasser, filtriert die Lösung, unter Nachspülen des Tiegels, in einen Scheidetrichter, dessen Abflußröhre vollkommen trocken ist, und fügt zum *klaren* Filtrat je nach dem vermuteten Jodgehalt

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 59 (1904).

5, 10 oder mehr ccm Chloroform. Nun säuert man vorsichtig mit verdünnter Schwefelsäure an, indem man jeweils nur kleine Mengen der Säure zusetzt und für Abkühlung sorgt, falls sich das Gemisch durch die Neutralisationswärme zu sehr erwärmen sollte. Reagiert das Gemisch sauer und ist die Kohlensäure möglichst ausgetrieben, so schüttelt man tüchtig durch, um das freie Jod in das Chloroform vollständig überzuführen. Sind mehr als Spuren von Jod vorhanden, so empfiehlt sich ein zwei- bis dreimaliges Ausschütteln mit neuen Mengen Chloroform; die verschiedenen Chloroformauszüge werden dann in einem Meßzylinder gemischt und ihr Gesamtvolumen wird bestimmt. Mit dieser klaren, ev. durch ein trockenes Filter gegossenen Jodchloroformlösung füllt man die Küvette des Autenrieth-Koenigsberger'schen Kolorimeters, verschiebt den geeichten Glaskeil mit der Vergleichslösung bis zur Farbengleichheit mit der Lösung in der Küvette und liest den zugehörigen Skalenteil am Kolorimeter ab. Wie bei allen derartigen kolorimetrischen Bestimmungen ist ein mehrmaliges Einstellen des Glaskeils auf Farbengleichheit mit jedesmaligem Ablesen notwendig. Von den verschiedenen Ablesungen legt man das arithmetische Mittel der Berechnung zugrunde. Aus der Eichungskurve des Glaskeils, der Jodkurve, erfährt man dann in Milligrammen die dem abgelesenen Skalenteile entsprechende Menge Jod, die in 1 ccm der Chloroformlösung enthalten ist. Selbstverständlich muß der so gefundene Wert auf die gesamte Jodchloroformlösung umgerechnet werden.

Die Eichung des „Jodkeils" und die Herstellung der Eichungskurve.

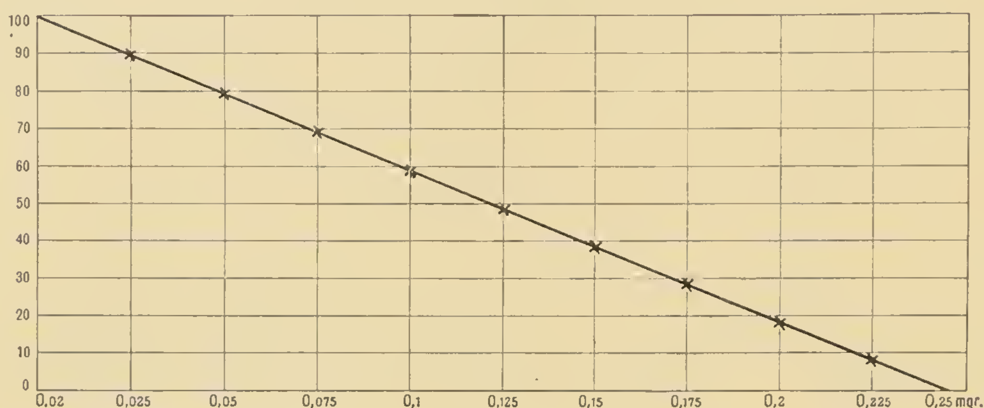
Wie bei den kolorimetrischen Bestimmungen des Traubenzuckers, Milchzuckers, des Kreatinins und Indikans im Harn, des Hämoglobins und Eisens im Blute mit Hilfe des Autenrieth-Königsberger'schen Kolorimeters (S. 126) muß auch bei dieser Bestimmung der die Vergleichslösung enthaltende Glaskeil erst geeicht werden. Man stellt sich eine Chloroformlösung her, welche in 100 ccm 0,25 g trockenes, reines Jod enthält, füllt mit dieser Lösung den Glaskeil des Kolorimeters und bringt einen Teil der Lösung in eine trockene Bürette; in eine zweite, ebenfalls trokkene Bürette gießt man Chloroform. Man mißt nun wechselnde Mengen der Jodlösung sehr genau ab, verdünnt jeweils mit Chloroform genau auf 10 ccm, füllt damit die Küvette des Kolorimeters und bestimmt dann durch Verschieben des Glaskeils den Skalenteil, bei welchem Farbengleichheit besteht. Auf diese Weise wurden die folgenden Skalenteile ermittelt.

ccm Jodlösung		ccm Chloroform	1 ccm enthält Jod	Abgelesener Skalenteil
1 ccm	+	9 ccm	0,025 mgr	89
2 »	+	8 »	0,05 »	79
3 »	+	7 »	0,075 »	67
4 »	+	6 »	0,10 »	58
5 »	+	5 »	0,125 »	48
6 »	+	4 »	0,15 »	38
7 »	+	3 »	0,175 »	28
8 »	+	2 »	0,20 »	19

Trägt man dann in der üblichen Weise auf Millimeterpapier in Milligrammen die Jodmengen, welche in je 1 ccm der Chloroformlösung enthalten sind, auf die Abscissenachse und die am Kolorimeter abgelesenen zugehörigen Skalenteile auf die Ordinatenachse eines Koordinatensystems ein, so bildet der Schnittpunkt der beiden Koordinaten jeweils einen Punkt der Jodkurve und die Verbindungslinie der so ermittelten Punkte stellt die Jodkurve selbst dar. Sie bildet eine Gerade, wie aus der Zeichnung zu ersehen ist.

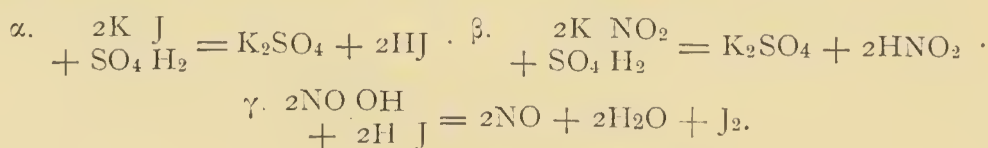
Jodkurve.

Fig. 28.



Jod in 1 ccm der Chloroformlösung.

Bemerkungen. Die kolorimetrischen Jodbestimmungen liefern meist recht genaue Werte, da bei nicht zu großen Jodkonzentrationen ein scharfes Einstellen auf Farbengleichheit bis auf einen Skalenteil am Kolorimeter möglich ist. — Hat man eine Schmelze mit Soda und Salpeter auszuführen, so wird der letztere, indem er auf organisches Material von Harn, Mageninhalt, Schilddrüse usw. einwirkt, zu salpetrigsaurem Salz reduziert, so daß dann ein Zusatz von Alkalinitrit zur Lösung der Schmelze nicht notwendig ist. Nur falls größere Mengen Jodmetall vorhanden sind, muß noch Kalium- oder Natriumnitrit zugesetzt werden. — Das Freiwerden von Jod beim Ansäuern der Jodid und Nitrit enthaltenden Lösung der Schmelze findet durch die folgenden Gleichungen eine plausible Erklärung:



$$\alpha.\ \begin{matrix} 2K\ J \\ +\ SO_4\ H_2 \end{matrix} = K_2SO_4 + 2HJ \cdot \quad \beta.\ \begin{matrix} 2K\ NO_2 \\ +\ SO_4\ H_2 \end{matrix} = K_2SO_4 + 2HNO_2 \cdot$$

$$\gamma.\ \begin{matrix} 2NO\ OH \\ +\ 2H\ J \end{matrix} = 2NO + 2H_2O + J_2.$$

Nachtrag.

Ueber Albumosen und deren Nachweis im Harn.

Die Albumosen oder Propeptone gehören wie die Peptone zu den intermediären hydrolytischen Spaltungsprodukten der natürlichen Eiweißstoffe. Man bezeichnet die Endprodukte der Zersetzung der Eiweißstoffe durch Fermente, nämlich durch proteolytische Enzyme, insofern diese Endprodukte noch Eiweißcharakter zeigen, allgemein als

Peptone und die Zwischenprodukte, welche bei der Peptonisierung der Eiweißstoffe entstehen, als Albumosen. Auch durch Einwirkung von Wasser bei höherer Temperatur, von Mineralsäuren, von Alkalien sowie von Mikroorganismen z. B. von Fäulnisbakterien auf Eiweißstoffe können Albumosen und Peptone entstehen. Es unterliegt keinem Zweifel, daß Albumosen und Peptone aus einem bisher untrennbaren Gemenge mehrerer Stoffe, höchst wahrscheinlich aus einem solchen von Polypeptiden und deren Anhydriden bestehen. Nach Kühne nennt man die durch Ammoniumsulfat ausfällbaren Spaltungsprodukte, soweit sie noch Eiweißcharakter haben, Albumosen und die durch dieses Ammoniumsalz nicht fällbaren Stoffe Peptone.

Während das Vorkommen von Albumosen im pathologischen Harne sicher festgestellt ist, hat man Pepton im Harne bis jetzt nicht mit aller Sicherheit nachweisen können.

Eigenschaften der Albumosen. Albumosen sind amorphe, mit Ausnahme der Heteroalbumose, in Wasser leicht lösliche Substanzen, deren Lösungen bei neutraler oder schwach saurer Reaktion beim Sieden nicht gerinnen und die Linksdrehung zeigen. Alle Albumosen werden beim Sättigen ihrer Lösungen mit Natriumsulfat bei 37° sowie mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Besonders charakteristisch für Albumosen ist das folgende Verhalten: Ihre wässerige Lösung wird bei Gegenwart von Salzen, wie dies beim albumosehaltigen Harne der Fall ist, durch Salpetersäure gefällt, und zwar löst sich der Niederschlag beim Erwärmen auf, um beim Erkalten wieder zu erscheinen. Auch in überschüssiger Salpetersäure ist der Niederschlag löslich. — Ferrocyankalium in Verbindung mit Essigsäure, also das Bödeker'sche Reagens, verhält sich gegen Albumosenlösung wie die Salpetersäure. Pikrinsäure, Gerbsäure, Phosphorwolframsäure sowie Quecksilberjodidjodkalium plus Salzsäure fällen Albumosenlösungen aus. Kupfersulfat und Kupferacetat rufen in manchen Albumosenlösungen Trübungen oder Niederschläge hervor, in anderen aber nicht. — Die Albumosen geben die Biuret- und die Xanthoproteinreaktion.

Nachweis der Albumosen im Harn.

Für den Nachweis der Albumosen kann der eiweißfreie oder der unter Essigsäurezusatz durch Aufkochen enteiweißte Harn mit Ammoniumsulfat gesättigt werden, wobei vorhandene Albumosen niedergeschlagen werden. Da aber durch Ammoniumsulfat das, eine biuretähnliche Reaktion gebende Urobilin ebenfalls gefällt wird, so kann somit das letztere einen Albumosengehalt vortäuschen, auch wenn der untersuchte Harn absolut albumosenfrei ist. Zum sicheren Nachweise von Albumosen in einem Harne arbeitet man nach einer der beiden folgenden Methoden.

2. Nach Devoto[1])-Bang[2]) ist die vorherige Entfernung von Eiweiß und mucinähnlicher Substanz nicht nötig. Man erhitzt in einem

1) Zeitschr. f. Physiol. Chem. 15, 465 (1891).
2) Skand. Archiv f. Physiologie 8, 272 (1898).

Reagensglase 10 ccm des fraglichen Harns mit 8 gr Ammoniumsulfat gerade bis zum Sieden, kocht nur einige Sekunden, zentrifugiert das noch heiße Flüssigkeitsgemisch sofort 1/2 bis 1 Minute und gießt die über dem Bodensatze stehende Flüssigkeit ab. Mit Hilfe eines Glasstabes zerreibt man den erhaltenen Bodensatz, zieht ihn zur Entfernung von stets beigemengtem Urobilin mehrmals mit Alkohol aus, erhitzt ihn dann, mit wenig Wasser aufgeschlemmt, zum Sieden und filtriert ab; hierbei bleibt das koagulierte Eiweiß zurück. Um das Urobilin vollständig zu entfernen, wird das Filtrat mit einigen Tropfen Schwefelsäure angesäuert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Schließlich wird die wässerige Flüssigkeit, also das Filtrat, nach dem Abpipettieren des Chloroforms für die Biuretprobe benutzt. Diese Albumosenprobe ist für klinische Zwecke recht brauchbar. Die Empfindlichkeitsgrenze soll bei etwa 0,05 Proz. Albumose liegen.

2. Nach P. Morawitz und R. Dietschy[1]) werden größere Mengen des in Frage kommenden Harnes in der folgenden Weise von Eiweiß befreit: 500 ccm Harn werden mit saurem phosphorsaurem Kalium schwach angesäuert und nach Zufügen des doppelten Volumens 96%igen Alkohols 5 bis 6 Stunden im nicht siedenden Wasserbade am Rückflußkühler bei einer Temperatur von 80 bis höchstens 90° im Innern des Kolbens gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert, das klare Filtrat bei 50—60° auf etwa 300 ccm eingeengt und nach Hinzufügen von wenig verdünnter Schwefelsäure, 2 ccm auf 100 ccm Urin, mit Zinksulfat in Substanz gesättigt. Der hierbei entstehende eventuell albumosenhaltige Niederschlag wird abfiltriert und zur Entfernung des Urobilins 24 Stunden mit absolutem Alkohol ausgezogen, der zweckmäßigerweise mehrmals gewechselt wird.

Man verwendet schließlich die wässerige Lösung des so urobilinfrei erhaltenen Niederschlags für die Biuretprobe.

Bemerkungen. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, sekundäre Albumosen im Harn noch bei einer Verdünnung von 1:5000 bis 1:10000 nachzuweisen, wenigstens für den Fall, daß man von 500 ccm Harn ausgeht. Die Methode erfordert zwar ziemlich viel Zeit, bietet aber andererseits die Sicherheit, daß der Harn vom Eiweiß vollständig befreit wird und daß durch das Verfahren selbst keine Albumosen aus Eiweiß abgespalten werden. — Morawitz und Dietschy fanden nur bei fieberhaften Krankheiten Albumosen im Harn und zwar bei 37,5% der untersuchten Fälle.

1) Archiv f. experim. Pathol. und Pharmak. 54, 92 (1906).

Register.

134